

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**UMA ABORDAGEM *YEAST TWO-HYBRID* PARA O
ESTUDO DA REPLICAÇÃO E PATOGÉNESE DO
VÍRUS DA HEPATITE DELTA**

ANA LEONOR VIDAL GOMES CASACA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE
DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR CELSO CUNHA

CO-ORIENTADOR: PROF. DOUTOR EDGAR DA CRUZ E SILVA

LISBOA 2011

AGRADECIMENTOS

Gostava de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram na concretização deste projecto:

Professor Celso Cunha, meu orientador. Por todo o apoio, dedicação e amizade. Pelo sentido crítico que me soube inculcar e pelo seu constante encorajamento. Pela partilha de conhecimento e ideias que me ajudaram a desenvolver o presente trabalho.

Professor Edgar da Cruz e Silva, pelo grande impulso que proporcionou a este projecto. Pela sua orientação e disponibilidade. Guardarei um eterno reconhecimento pelo seu apoio.

Professora Margarida Fardilha, pela sua preciosa colaboração neste trabalho. Por tão bem me ter recebido em Aveiro e pela sua constante disponibilidade, mesmo à distância. Quero também estender o meu agradecimento a todos os que me acolheram e apoiaram nos Laboratórios de Neurociências e de Transdução de Sinais, do Centro de Biologia Celular, da Universidade de Aveiro.

Marta Mendes e Carolina Alves, que foram, efectivamente, as minhas colegas de bancada. Com quem foi possível discutir, ouvir e partilhar protocolos, resultados e ideias. Um agradecimento especial à Carolina por me passar a dissertação a *pente fino*.

Todos os que se cruzaram comigo no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, durante estes últimos anos, e com os quais partilhei vários momentos. Sérgio Mota, Natália Freitas, Louise Rodrigues, Sofia Borges, Stephan Hütter, Joana Silva, Cristina Branco, Claudia Istrate. Um obrigada especial à Gisela Henriques por ter sempre um conselho guardado para me dar.

Dona Fernanda, pela sua disponibilidade inesgotável.

Todos os que contextualizam a minha vida *não-laboratório*. Ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão pelo apoio incondicional. À minha avó e à minha tia, à Sara, ao Rafael, aos meus explicandos, Maria, Simão e Tomé, sempre tão interessados no meu trabalho. Ao Vitor, porque consegue sempre fazer-me acreditar que consigo, por que me ajuda a *desligar* quando é preciso e porque a confiança que sinto que tem em mim, dá-me forças para seguir em frente. Sem eles este projecto não faria o mesmo sentido.

RESUMO

O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente etiológico de uma das formas mais graves de hepatite viral e é ainda endémico em diversas regiões do globo, nomeadamente em África, na Amazónia e no Extremo Oriente. O HDV co-infecta ou super-infecta hepatócitos infectados com o vírus da hepatite B (HBV) aumentando em cerca de 10 vezes o risco de cirrose e hepatite fulminante. A associação clínica entre os dois vírus deve-se ao facto do invólucro do HDV ser constituído pelos antígenos de superfície do HBV (HBsAgs) que são necessários para a propagação da infecção.

O genoma do HDV é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples, circular, com cerca de 1.7 Kb, que possui cerca de 70% de emparelhamento interno. Foi identificada uma única grelha de leitura aberta (ORF) no RNA viral que codifica para o antígeno delta (HDAg). A ocorrência de um mecanismo de *editing* do RNA, resulta na expressão de duas formas do HDAg, a pequena (S-HDAg) e a grande (L-HDAg).

Várias funções essenciais para a replicação do HDV têm sido atribuídas a ambas as formas do HDAg, sendo a S-HDAg essencial para a acumulação de RNA viral e a L-HDAg responsável pela interacção com os HBsAgs para formar partículas virais. No entanto, dada a simplicidade dos seus componentes, admite-se que a replicação viral depende das interacções estabelecidas entre os HDAGs e factores celulares do hospedeiro. Apesar do número considerável de factores celulares descritos como interactores dos HDAGs ou RNA virais, a importância de muitas destas interacções não foi elucidada e muitas etapas do ciclo de replicação do HDV permanecem pouco claras. Para além disso, dado o número limitado de factores do hospedeiro que estão envolvidos na sua replicação, é muito provável que um número elevado de interactores do HDV permaneça por identificar.

Este trabalho teve como objectivo a identificação de proteínas de fígado humano capazes de interagir com os HDAGs, utilizando o sistema *yeast Two-Hybrid* (YTH). Identificaram-se trinta proteínas com capacidade de interagir com a S-HDAg no sistema YTH, sendo que estas proteínas se encontram envolvidas em diferentes processos celulares. Com base nas características funcionais, foram seleccionadas três destas proteínas e as suas interacções com a S-HDAg foram investigadas com maior detalhe. As três proteínas seleccionadas foram a ribonucleoproteína nuclear heterogénea C (hnRNPC), a *embryonic lethal abnormal vision like1* (ELAVL1/HuR) e a proteína 2 de ligação a EBNA1 (EBP2). As duas primeiras são proteínas de ligação a RNA, previamente descritas como envolvidas em processos de

replicações de outros vírus com genoma RNA, enquanto a EBP2, é uma proteína de localização preferencialmente nucleolar, tal como por vezes acontece com os HDAGs.

As interações foram analisadas recorrendo a vários ensaios bioquímicos. No caso da hnRNPc e da HuR, após validação no sistema YTH, a capacidade de interação com a S-HDAg foi confirmada quer *in vitro* por *blot overlay* quer *in vivo* por co-imunoprecipitação em células de hepatoma humano. Nas mesmas células, observou-se uma co-localização considerável entre os HDAGs e os RNAs virais. Finalmente, de modo a investigar a contribuição das proteínas hnRNPc e HuR na replicação do HDV, procedeu-se ao silenciamento destas proteínas pela utilização de *short hairpin* RNAs (shRNAs) específicos para os mRNAs correspondentes. Observou-se que o silenciamento de ambas as proteínas hnRNPc e HuR endógenas, individualmente resultou numa diminuição acentuada nos níveis de expressão dos HDAGs.

No que respeita à EBP2, a interação com a S-HDAg foi confirmada em condições *in vitro* com recurso a ensaios de *blot overlay* e de cromatografia de afinidade. A análise por imunofluorescência indirecta e microscopia confocal revelou co-localização elevada entre os HDAGs e a EBP2, principalmente nos nucléolos de células de hepatoma humano.

Finalmente, foi ainda utilizado o sistema YTH para estudar os mecanismos de importação dos HDAGs. Assim, este sistema foi utilizado com o propósito de identificar proteínas celulares capazes de interagir com um domínio específico dos HDAGs, o sinal de localização nuclear (NLS). Na pesquisa YTH realizada obtiveram-se 161 clones positivos, sendo que um deles mostrou codificar para a carioferina $\alpha 4$ (KPNA4). A interação da KPNA4 com a S-HDAg foi reproduzida em condições *in vitro* através de um ensaio de cromatografia de afinidade tendo sido utilizadas formas recombinantes das duas proteínas.

Este trabalho permitiu identificar várias proteínas celulares que interagem com a S-HDAg. Obtiveram-se evidências sugestivas de que algumas das proteínas identificadas podem desempenhar funções importantes no ciclo de replicação do HDV e que abrem novas perspectivas para o estudo do ciclo de replicação do vírus.

ABSTRACT

Hepatitis delta virus (HDV) is the causative agent of one of the most severe forms of viral hepatitis and is still endemic in populations from Africa, Amazon basin and Far East. HDV infects liver cells already infected with Hepatitis B virus (HBV) and increases the severity and risks of fulminant disease. HDV replication occurs independently of the replication of the helper virus but needs its surface antigens (HBsAgs) to assemble in viral particles.

The HDV genome consists of a 1.7 Kb single-stranded, negative-polarity circular RNA molecule which bears about 70% of internal base-pairing. The genome contains a single ORF from which two forms of the same protein, the small and the large delta antigens (S-HDAg and L-HDAg, respectively) are derived as a consequence of an editing mechanism.

Several functions have been assigned to both forms of the delta antigen and it is consensual that S-HDAg is necessary for RNA accumulation, and L-HDAg interacts with HBsAgs playing an important role during virus packaging. However, due to its simplicity it is likely that HDV replication is highly dependent on the interactions between HDAGs and host cellular factors. Despite the increasing number of cellular factors described as HDV RNA or antigens' partners, the role of most of these interactions in HDV replication were not elucidated, and many steps of the virus life cycle remain unclear. Furthermore, given the limited number of host factors found to play a role in its replication, it is highly probable that still a considerable number remains to be discovered.

The main purpose of this work was to identify human liver proteins that interact with HDAGs using the yeast two-hybrid (YTH) system. Thirty known proteins involved in different cellular processes were identified as S-HDAg interactors. Given their functional properties three proteins were selected for further analysis. These proteins include heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (hnRNP), embryonic lethal abnormal vision like 1 (ELAVL1/HuR) and EBNA1 binding protein 2 (EBP2). hnRNP and HuR are RNA binding proteins that were shown to play important roles during replication of different virus. EBP2 is a preferentially nucleolar protein, as sometimes also occurs for HDAGs.

The selected interactions were further explored using different biochemical approaches. Having validated hnRNP and HuR interactions with S-HDAg in the YTH system, we were able to confirm both interactions *in vitro* using a blot overlay assay and *in vivo* using co-immunoprecipitation assays in human hepatoma cells. Furthermore, the two proteins were found to co-localize with HDAGs and HDV RNAs in liver cells. Finally, reducing hnRNP and

HuR expression in cells undergoing HDV replication, using specific short hairpin RNAs (shRNAs), it was possible to observe a marked decrease in both S-HDAg and L-HDAg protein expression.

S-HDAg/EBP2 interaction was also confirmed *in vitro* using blot overlay and pull-down assays. Indirect immunofluorescence and confocal microscopy analysis revealed a strong co-localization of EBP2 and HDAg mainly in the nucleoli of human hepatoma cells.

Finally, in order to investigate the nuclear import mechanism of HDAg we performed a YTH screening to identify cellular proteins able to interact with the nuclear localization signal (NLS) of HDAGs. 161 positive clones were obtained allowing the identification of karyopherin- α 4 (KPNA4). Having established the S-HDAg/KPNA4 interaction in the YTH system, it was further confirmed *in vitro* using a pull down assay with bacterially expressed recombinant proteins in a pull down assay.

This study allowed the identification of several cellular proteins as S-HDAg partners. We found evidences suggesting that some of these proteins may play important roles in HDV replication cycle, opening new possibilities for the study of the viral replication.

PUBLICAÇÕES

Casaca A., Fardilha M., da Cruz e Silva E. and Cunha C. (2010) *In vivo interaction of the hepatitis delta virus small antigen with the ELAV-Like protein HuR*. The Open Virology Journal, Vol. 4, pp 198-207.

Casaca A., Fardilha M., da Cruz e Silva E. and Cunha C. *The heterogeneous ribonuclear protein C (hnRNP C) interacts in vivo with the hepatitis delta virus small antigen* (submitted).

Casaca A., Fardilha M., da Cruz e Silva E. and Cunha C. *Karyopherin α -4 mediates the nuclear import hepatitis delta antigen* (in prep.)

ABREVIATURAS

3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
3'UTR	Região não traduzida na extremidade 3' de mRNA
3NLS	Três cópias em <i>tandem</i> do NLS
5'UTR	Região não traduzida na extremidade 5' de mRNA
aa	Aminoácido
AD	Domínio de activação
ADAR	Deaminase de adenosina de RNA
Ade	Adenina
APS	Persulfato de amónio
ARE	Sequência rica em AUs
ARM	<i>Armadillo</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Par de bases
BSA	Albumina bovina sérica
CAT	Acetiltransferase do cloranfenicol
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDS	Sequência codificante
CID	Domínio de oligomerização C1-C1
dATP	Trifosfato de adenina
dCTP	Trifosfato de citosina
DIG	Digoxigenina
dGTP	Trifosfato de guanina
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DNA-BD	Domínio de ligação a DNA
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleótido
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de timina
EBNA1	Antigénio nuclear 1 do vírus Epstein-Barr
EBP2	Proteína 2 de ligação a EBNA1
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELAVL	Semelhante a <i>embryonic lethal abnormal vision</i>
FBS	Soro bovino fetal
FGF3	Factor 3 de crescimento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

GAL4	Factor de transcrição GAL4
GAL4-AD	Domínio de activação GAL4
GAL4-BD	Domínio de ligação GAL4
GST	Glutathione S-transferase
HDAg	Antigénio delta
HBV	Vírus da hepatite B
HBsAgs	Antigénios de superfície do HBV
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
HCV	Vírus da hepatite C
HDV	Vírus da hepatite delta
His	Histidina
HuR	Hu antigénio R
HVS	Herpesvirus saimiri
INF- α	Interferão- α
INF-PEG	Interferão conjugado com polietileno glicol
IRES	Local interno de entrada no ribossoma
JaCoP	Just another Co-localization Plug-in
KPNA4	Carioferina- α 4
L-HBsAg	Forma grande dos antigénios de superfície do HBV
L-HDAg	Forma grande do antigénio delta
Leu	Leucina
LiAc	Acetato de lítio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
M-HBsAg	Forma média dos antigénios de superfície do HBV
NES	Sinal de exportação nuclear
NLS	Sinal de localização nuclear
NoBP	Proteína de ligação nucleolar
NP-40	Nonidet P40
NPC	Complexo dos poros nucleares
nt	Nucleótido
OC	Coeficiente de sobreposição de Mander
OD	Densidade óptica
OLIG	Sinal de oligomerização
ORF	Grelha de leitura aberta
pb	Par de bases
p53	Proteína p53
PBS	Solução salina tamponada por fosfatos
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
PEG	Glicol de polietileno

PMSF	Fenil metilsufóxido
Poli-Hist	Seis resíduos de histidina consecutivos
PREN	Sinal de prenilação
QDO	Meio selectivo quádruplo
RanGDP	GTPase Ran ligada a GDP
RanGTP	GTPase Ran ligada a GTP
RBD	Domínio de ligação a RNA
RBP	Proteínas de ligação a RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNase	Ribonuclease
RNP	Ribonucleoproteína
SD	Meio mínimo sintético
SDS	Dodecilsulfato de sódio
<i>SDS-PAGE</i>	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
S-HBsAg	Forma pequena dos antígenos de superfície do HBV
S-HDAg	Forma pequena do antígeno delta
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interference</i> RNA
SV-40	Antígeno T grande do vírus símio 40
TDO	Meio selectivo triplo
TE	Tris-EDTA
TR	Texas Red
Tween 20	Monolaurato de polioxietileno-sorbitano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
Triton X-100	Octilfenoxipoliétoxietanol
tRNA	RNA de transferência
Trp	Triptofano
X- α -Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranoside
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao cromossoma X
YPD	Meio com extracto de levedutra, peptona e dextrose para cultura de <i>S. cerevisiae</i>
YPDA	YPD suplementado com adenina
YTH	Yeast two-hybrid

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
PUBLICAÇÕES	VII
ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL: O VÍRUS DA HEPATITE DELTA.....	1
I.1 O vírus da hepatite delta (HDV)	3
I.1.1 Patologia	3
I.1.2 Epidemiologia	4
I.1.3 Tratamento e prevenção	6
I.1.4 Biologia	8
I.1.4.1 O agente viral.....	8
I.1.4.2 Ciclo de replicação do HDV	11
I.1.4.2.1 Entrada do vírus na célula hospedeira e desempacotamento	11
I.1.4.2.2 Síntese de RNA	11
I.1.4.2.3 Formação de partículas virais.....	14
I.1.5 Considerações finais	15
I.1.6 Objectivos gerais	16
CAPÍTULO II: PESQUISA DE INTERACÇÕES ENTRE OS HDAGs E PROTEÍNAS DE FÍGADO HUMANO, PELO SISTEMA YEAST TWO-HYBRID	17
II.1 Introdução	19
II.1.1 Princípios do sistema YTH	19
II.1.2 Desenvolvimento do sistema YTH.....	21
II.1.3 Limitações do sistema YTH.....	22
II.1.4 Sistemas YTH alternativos.....	23
II.1.5 Aplicações do sistema YTH.....	24
II.2 Objectivos.....	27
II.3 Materiais e Métodos	29
II.3.1 Sistema YTH	29
II.3.1.1 Estirpes de levedura	29
II.3.1.2 Vectores	29
II.3.1.3 Construção de plasmídeos isco.....	30
II.3.1.4 Transformação de células de levedura	32
II.3.1.5 Teste de auto-activação.....	32
II.3.1.6 Análise da expressão das proteínas isco em levedura.....	32
II.3.1.6.1 Preparação de extractos proteicos	33
II.3.1.6.2 Electroforese em géis de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	33
II.3.1.6.3 Western blot	34
II.3.1.7 Conjugação de células de levedura de tipos opostos	35
II.3.2 Análise dos clones positivos.....	36
II.3.2.1 Extracção de plasmídeos de células de levedura.....	36
II.3.2.2 Sequenciações de DNA	36
II.4 Resultados	39
II.4.1 Estudo das propriedades de auto-activação das proteínas isco	39
II.4.2 Pesquisa de interacções	41
II.4.3 Isolamento e identificação de possíveis interactores	43
II.4.4 Análise das sequências de cDNA.....	45
II.5 Discussão	49

CAPÍTULO III: hnRNPC1/C2: UM NOVO INTERACTOR DA S-HDAg	61
III.1 Introdução	63
III.1.1 A família das ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs)	63
III.1.2 hnRNPC.....	63
III.1.2.1 Estrutura	64
III.1.2.2 Função.....	65
III.2 Objectivos.....	67
III.3 Materiais e Métodos	69
III.3.1 Sistema YTH.....	69
III.3.1.1 Sequenciação de DNA	69
III.3.1.2 Preparação de extractos proteicos de levedura	69
III.3.1.3 Construção de mutantes de deleção da S-HDAg no plasmídeo pAS2-1.....	69
III.3.1.4 (Co)transformação de células de levedura	70
III.3.2 Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	71
III.3.2.1 Vectores	71
III.3.2.2 Construção de plasmídeos para expressão de proteínas de fusão.....	71
III.3.2.3 Produção de proteínas de fusão	72
III.3.2.4 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade	72
III.3.3 <i>Blot overlay</i>	73
III.3.4 Cultura de células eucariotas	74
III.3.5 Transfecção transitória de células eucariotas	74
III.3.6 Preparação de extractos de células eucariotas	74
III.3.7 Co-imunoprecipitação	75
III.3.8 Imunofluorescência indirecta.....	76
III.3.9 Hibridação <i>in situ</i>	76
III.3.9.1 Marcação de sonda por <i>nick-translation</i>	76
III.3.9.2 Hibridação <i>in situ</i>	77
III.3.10 Microscopia confocal	78
III.3.11 Sistema para indução de RNA de interferência.....	78
III.3.11.1 Escolha das sequências alvo	79
III.3.11.2 Construção do vector pSIREN-RetroQ/hnRNPC	80
III.3.11.3 Silenciamento da proteína hnRNPC em células de hepatoma humano	81
III.4 Resultados	83
III.4.1 A proteína hnRNPC interage com a S-HDAg no sistema YTH	83
III.4.2 A região C-terminal da S-HDAg é responsável pela interacção com a proteína hnRNPC.....	84
III.4.3 A proteína hnRNPC interacciona com a S-HDAg <i>in vitro</i>	86
III.4.3.1 Produção e purificação de proteínas recombinantes	86
III.4.3.2 Confirmação da interacção S-HDAg/hnRNPC por <i>blot overlay in vitro</i>	87
III.4.4 hnRNPC e HDAg interaccionam <i>in vivo</i> em células de hepatoma humano	88
III.4.5 A proteína hnRNPC co-localiza com os antígenos e RNAs do HDV em células de hepatoma humano ..	89
III.4.6 O silenciamento da hnRNPC resulta numa diminuição da expressão dos HDAGs.....	91
III.5 Discussão	93
CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO DA INTERACÇÃO HUR/S-HDAg.....	99
IV.1 Introdução	101
IV.1.1 A família de proteínas HU/ELAVL.....	101
IV.1.2 ELAVL1/HuR	101
IV.2 Objectivos.....	105
IV.3 Materiais e Métodos	107
IV.3.1 Sistema YTH	107
IV.3.1.1 Sequenciação de DNA.....	107
IV.3.1.2 Preparação de extractos proteicos de levedura	107
IV.3.1.3 (Co)transformação de células de levedura	107
IV.3.2 Expressão e purificação de proteínas recombinantes	107
IV.3.2.1 Vectores	107
IV.3.2.2 Construção de plasmídeos para expressão de proteínas de fusão recombinantes	107

IV.3.2.3 Produção de proteínas de fusão.....	108
IV.3.2.4 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade.....	108
IV.3.3 <i>Blot overlay</i>	108
IV.3.4 Cultura de células eucariotas.....	108
IV.3.5 Transfecção transitória de células eucariotas	108
IV.3.6 Preparação de extractos de células eucariotas	108
IV.3.7 Co-imunoprecipitação	108
IV.3.8 Imunofluorescência indirecta	109
IV.3.9 Hibridação <i>in situ</i>	109
IV.3.9.1 Marcação de sonda por <i>nick-translation</i>	109
IV.3.9.2 Hibridação <i>in situ</i>	109
IV.3.10 Microscopia confocal	109
IV.3.11 Sistema para indução de RNA de interferência	109
IV.3.11.1 Escolha das sequências alvo	109
IV.3.11.2 Construção do vector pSIREN-RetroQ/HuR.....	110
IV.3.11.3 Silenciamento da proteína HuR em células de hepatoma humano	110
IV.4 Resultados.....	111
IV.4.1 A proteína HuR interactua com a S-HDAg no sistema YTH.....	111
IV.4.2 A proteína HuR interage com a S-HDAg <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	113
IV.4.3 A proteína HuR co-localiza com os antígenos e RNAs do HDV em células de hepatoma humano.....	115
IV.4.4 A proteína HuR encontra-se sobre-expressa em células de hepatoma humano que expressam os componentes do HDV	116
IV.4.5 O silenciamento da HuR resulta numa diminuição da expressão dos HDAGs	117
IV.5 Discussão.....	119
CAPÍTULO V: EBP2, UMA PROTEÍNA NUCLEOLAR IMPORTANTE NA SEGREGAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS EPSTEIN-BARR, INTERAGE COM A S-HDAg	123
V.1 Introdução.....	125
V.1.1. Proteína 2 de ligação a EBNA1 (EBP2)	125
V.2 Objectivos	129
V.3 Materiais e Métodos	131
V.3.1 Sistema YTH	131
V.3.1.1 Sequenciação de DNA	131
V.3.1.2 Preparação de extractos proteicos de levedura.....	131
V.3.1.3 (Co)transformação de células de levedura.....	131
V.3.2 Expressão e purificação de proteínas recombinantes	131
V.3.2.1 Vectores.....	131
V.3.2.2 Construção de plasmídeos para expressão de proteínas de fusão recombinantes	131
V.3.2.3 Produção de proteínas de fusão.....	132
V.3.2.4 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade.....	132
V.3.3 <i>Blot overlay</i>	132
V.3.4 Ensaio de cromatografia de afinidade	132
V.3.5 Cultura de células eucariotas.....	133
V.3.6 Imunofluorescência indirecta	133
V.3.7 Microscopia confocal.....	133
V.4 Resultados.....	135
V.4.1 A proteína EBP2 interactua com S-HDAg no sistema YTH	135
V.4.2 EBP2 interactua com S-HDAg <i>in vitro</i>	136
V.4.3 A proteína EBP2 co-localiza com os HDAGs em células de hepatoma humano.....	138
V.5 Discussão.....	141
CAPÍTULO VI: ESTUDO DA INTERACÇÃO DA KPNA4 COM O NLS DOS HDAGs	145
VI.1 Introdução.....	147
VI.1.1. Importação nuclear de proteínas	147
VI.1.2. Importação nuclear dos HDAGs	148
VI.2 Objectivos	151

VI.3 Materiais e Métodos	153
VI.3.1 Sistema YTH	153
VI.3.1.1 Sequenciação de DNA	153
VI.3.1.2 Preparação de extractos proteicos de levedura	153
VI.3.1.3 (Co)transformação de células de levedura	153
VI.3.2 Expressão e purificação de proteínas recombinantes	153
VI.3.2.1 Vectores	153
VI.3.2.2 Construção de plasmídeos para expressão de proteínas de fusão recombinantes	153
VI.3.2.3 Produção de proteínas de fusão	154
VI.3.2.4 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade	154
VI.3.3 Ensaio de cromatografia de afinidade	154
VI.3.4 Cultura de células eucariotas	154
VI.3.5 Imunofluorescência indirecta	154
VI.3.6 Microscopia confocal	154
VI.4 Resultados	155
VI.4.1 A KPNA4 interacciona com a S-HDAg no sistema YTH	155
VI.4.2 A proteína KPNA4 interacciona com a S-HDAg <i>in vitro</i>	156
VI.4.3 A KPNA4 é expressa em células de hepatoma humano durante a replicação do HDV	158
VI.5 Discussão	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.2.1: Epidemiologia global da infecção pelo HDV de acordo com o genótipo viral.	6
Figura I.1.4.1: Representação esquemática das três espécies de RNA resultantes da replicação do HDV.	10
Figura I.1.4.2: Representação esquemática dos domínios funcionais presentes nas S-HDAg e L-HDAg.	10
Figura II.1.1.1: O sistema yeast two hybrid clássico.	20
Figura II.4.1.1: Expressão das proteínas de fusão DNA-BD/S-HDAg, DNA-BD/L-HDAg, DNA-BD/3NLS-SDAg e em células de levedura AH109.	39
Figura II.4.1.2: Teste de auto-ativação de genes repórteres pelas proteínas DNA-BD/S-HDAg, DNA-BD/L-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg.	40
Figura II.4.1.3: Teste de auto-ativação de genes repórteres pelas proteínas DNA-BD/ext_L-HDAg.	41
Figura II.4.2.1: Clones positivos identificados nos ensaios YTH com a proteína S-HDAg e 3NLS-HDAg.	42
Figura II.4.2.2: Fluxograma resumindo o procedimento e resultados obtidos nos ensaios YTH realizados.	43
Figura II.4.3.1: Análise dos padrões de restrição enzimática pela enzima <i>Hind</i> III apresentados pelos plasmídeos isolados dos clones positivos.	44
Figura II.4.4.1: Fluxograma resumindo o procedimento e resultados obtidos na análise dos plasmídeos de clones positivos obtidos no ensaio YTH para a S-HDAg.	45
Figura III.1.2.1: Representação esquemática dos domínios funcionais identificados na hnRNPC.	65
Figura III.3.11.1: Representação esquemática da estrutura dos oligonucleótidos utilizados para clonar no vector pSiREN-RetroQ e do respectivo shRNA produzido.	79
Figura III.4.1.1: Identificação da proteína hnRNPC como interactor da S-HDAg, no sistema YTH.	84
Figura III.4.2.1: Identificação dos domínios da S-HDAg envolvidos na interacção com a hnRNPC pelo sistema YTH.	85
Figura III.4.3.1: Análise por <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i> das proteínas recombinantes His ₆ /hnRNPC, GST/S-HDAg e S-HDAg.	87
Figura III.4.3.2: Interacção <i>in vitro</i> de hnRNPC e S-HDAg.	88
Figura III.4.4.1: Interacção <i>in vivo</i> de hnRNPC e S-HDAg.	89
Figura III.4.5.1: Co-localização de hnRNPC com os antígenos e RNA de HDV.	90
Figura III.4.6.1: O silenciamento da proteína hnRNPC endógena reduz a expressão de HDAGs em células Huh7-D12.	92
Figura IV.1.2.1: Representação esquemática dos domínios funcionais identificados em HuR.	102
Figura IV.4.1.1: Identificação da proteína HuR como interactor da S-HDAg no sistema YTH.	111
Figura IV.4.1.2: Confirmação da interacção S-HDAg/HuR no sistema YTH.	112
Figura IV.4.2.1: Análise por <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i> da proteína recombinante His ₆ /HuR.	113
Figura IV.4.2.2: Interacção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de HuR e S-HDAg.	114
Figura IV.4.3.1: Co-localização de HuR com os antígenos e RNA de HDV.	116
Figura IV.4.4.1: Sobre-expressão da HuR em células Huh7-D12.	117
Figura IV.4.5.1: O silenciamento da proteína HuR endógena reduz a expressão de HDAGs em células Huh7-D12.	118
Figura V.4.1.1: Identificação da proteína EBP2 como interactor da S-HDAg no sistema YTH.	135
Figura V.4.1.2: Confirmação da interacção entre S-HDAg e EBP2 no sistema YTH.	136
Figura V.4.2.1: Análise por <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i> da proteína recombinante His ₆ /EBP2 e GST/S-HDAg.	138
Figura V.4.2.2: Interacção <i>in vitro</i> de EBP2 e S-HDAg.	139
Figura V.4.3.1: Co-localização de EBP2 com os HDAGs.	140
Figura VI.4.1.1: Identificação da proteína KPNA4 como interactor do NLS dos HDAGs no sistema YTH.	156
Figura VI.4.1.2: Confirmação da interacção S-HDAg/KPNA4 ₁₋₃₃₈ no sistema YTH.	157
Figura VI.4.2.1: Análise por <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i> da proteína recombinante His ₆ /KPNA4.	157
Figura VI.4.2.2: Interacção <i>in vitro</i> de KPNA4 e S-HDAg.	158
Figura VI.4.3.1: Localização de KPNA4 e HDAg em células de hepatoma humano.	159

CAPÍTULO I

Introdução geral: O vírus da hepatite delta

I.1 O VÍRUS DA HEPATITE DELTA (HDV)

A hepatite delta é uma doença viral disseminada por quase todas as regiões do globo. O vírus responsável por esta doença, o vírus da hepatite delta (HDV), foi descoberto em 1977 pelo gastroenterologista italiano Mário Rizzetto, durante a observação de biopsias hepáticas de indivíduos infectados com o vírus da hepatite B (HBV; Rizzetto *et al.*, 1977). O antígeno delta (HDAg) foi detectado por imunofluorescência e, apesar de inicialmente ter sido admitido como específico do HBV, veio a demonstrar-se tratar-se de um marcador associado a um patógeno humano desconhecido até à data, o HDV.

Estudos posteriores demonstraram que o HDAg faz parte de um agente infeccioso, o HDV, cujo genoma consiste numa cadeia simples de RNA circular e que necessita dos antígenos de superfície do HBV (HBsAg) para empacotamento das suas partículas infecciosas (Rizzetto *et al.*, 1980; Smedile *et al.*, 1994). Deste modo, ficou demonstrada a existência de uma associação clínica entre os dois vírus, sendo que a presença do HBV é obrigatória para o estabelecimento de uma infecção transmissível pelo HDV. O HDV é, portanto, um vírus defectivo, satélite do HBV.

Até à data, não se conhecem outros agentes satélites humanos que dependam exclusivamente da função auxiliar do HBV, para completar os seus ciclos de replicação. Também, o HDV não se assemelha com nenhum agente infeccioso animal conhecido e transmissível, no que respeita a características estruturais do seu genoma. Consequentemente, foi apresentado em 1996 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* como o único representante de um novo género, o *Deltavirus* (Murphy, 1996).

I.1.1 PATOLOGIA

O HDV é um vírus altamente patogénico responsável por uma forma de doença hepática grave. As alterações patológicas limitam-se ao fígado e coincidem com as observáveis em outras hepatites virais, nomeadamente necrose hepatocelular e inflamação. Assim, histologicamente, a hepatite delta é praticamente indistinguível de outras formas de hepatite causadas por agentes virais (Rizzetto *et al.*, 1983).

O quadro clínico de uma infecção por HDV pode ser bastante variável, causando hepatites agudas ou crónicas. Geralmente, ocorre um agravamento dos sintomas comparativamente ao observado noutras formas de hepatite. Após o período de incubação, que varia de 3 a 7 semanas, observam-se os primeiros sintomas que incluem fadiga, letargia, anorexia e

náuseas (Rizzetto *et al.*, 1983). Em casos extremos, as infecções agudas podem progredir para uma forma mais severa de hepatite, a hepatite fulminante, caracterizada por falência hepática. Nestas situações observam-se encefalopatias hepáticas, responsáveis por alterações de personalidade, distúrbios de sono, falta de concentração e, nos casos mais graves, podem ocorrer comportamentos anormais, sonolência e coma (Purcell *et al.*, 1990). A hepatite viral fulminante, é cerca de dez vezes mais comum em infecção por HDV do que em outros tipos de hepatite (Gerin *et al.*, 2001).

No que respeita às infecções crónicas, em cerca de 60% a 80% dos casos há desenvolvimento de cirrose. Esta taxa é 3 vezes superior à observada para o HBV e vírus da hepatite C (HCV; Gerin *et al.*, 2001). Foi também descrito o aparecimento de carcinoma hepatocelular em alguns indivíduos com hepatite delta crónica (Fattovich *et al.*, 2000; Romeo *et al.*, 2009).

Dadas as suas características de vírus satélite, o HDV pode ser transmitido por co-infecção ou super-infecção, se transmitido em simultâneo ou a indivíduos previamente infectados pelo HBV, respectivamente.

No caso de co-infecção, a expressão clínica do HDV varia muito podendo progredir para hepatite fulminante numa frequência superior à observada na infecção somente por HBV (Smedile *et al.*, 1982). A evolução para hepatite crónica é rara, sendo a taxa de cronicidade inferior a 5%, ou seja, semelhante à observada em infecções isoladas por HBV (Hsieh *et al.*, 2006).

A super-infecção pelo HDV de indivíduos com hepatite B resulta num agravamento dos sintomas. Por sua vez, no caso de portadores assintomáticos de HBsAgs, a super-infecção pelo HDV origina o aparecimento de sintomas de hepatite. Em ambos os casos, a presença prévia de HBsAgs proporciona a rápida formação de partículas virais de HDV (Gerin *et al.*, 2001). Consequentemente, em cerca de 70% a 90% dos casos, há progressão para hepatite crónica (Hsieh *et al.*, 2006).

I.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que o número de portadores crónicos de HBV ronde os 350 milhões. Em 2004, as estimativas indicavam que quase 20 milhões destes indivíduos, cerca de 5%, se encontravam igualmente infectados pelo HDV (Radjef *et al.*, 2004).

A distribuição mundial da infecção pelo HDV apresenta um padrão generalizado mas pouco uniforme (figura I.1.2.1). As regiões descritas como endémicas incluem a bacia do

Mediterrâneo, o Médio Oriente, a Ásia Central, algumas ilhas do Pacífico e a bacia do Amazonas (Hsieh *et al.*, 2006). No caso da região Amazónica brasileira, a hepatite delta representa um problema grave de saúde pública, tendo chegado a atingir valores de prevalência superiores a 85% em pacientes com hepatite crónica (Torres, 1996). Também no sul da Europa, a hepatite delta é bastante endémica. Vários estudos realizados entre 1980 e 1990 revelaram que, em Itália, a prevalência da infecção do HDV em portadores de HBsAg chegou a ultrapassar os 20% (Farci, 2003).

Desde 1990 têm-se verificado algumas mudanças no padrão epidemiológico da hepatite delta. Apesar da bacia do Amazonas, permanecer um importante reservatório para novos surtos de infecção (Manock *et al.*, 2000), a circulação do HDV diminuiu significativamente em algumas zonas consideradas endémicas, nomeadamente no sul da Europa. A comparação de análises estatísticas realizadas no Sul de Itália permitiu verificar que as taxas de prevalência de HDV diminuíram quase 50% de 1987 para 1997 (Gaeta *et al.*, 2000). Reduções consistentes nas taxas de prevalência do HDV foram também observadas em Espanha (Navascués *et al.*, 1995) e na Turquia (Degertekin *et al.*, 2006). A diminuição verificada na prevalência do HDV ficou a dever-se principalmente à implementação de medidas de prevenção contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vacinação global contra o HBV, assim como alterações nos padrões de comportamento (Gaeta *et al.*, 2000).

A redução acentuada da prevalência da hepatite delta na Europa perspectivou a ideia de que a doença seria rapidamente eliminada da lista de doenças endémicas (Gaeta *et al.*, 2000). Todavia, nos últimos anos, em países da Europa Central e do Norte, a tendência para a redução das taxas de prevalência do HDV, deixou de ser observada. Em Londres, a prevalência manteve-se estável (aproximadamente 8.2%) entre 2000 e 2006 (Cross *et al.*, 2008). Em Hanôver, a prevalência diminuiu de 18.6% em 1992 para 6.8% em 1997 mas não se observou nenhuma redução desde essa data (Wedemeyer *et al.*, 2007), sendo que a maioria dos pacientes consiste em imigrantes provenientes da Turquia e ex-União Soviética. Também em França se mantém uma população estável de HDV, representada pelos imigrantes africanos (Le Gal *et al.*, 2006).

Assim, a Europa permanece um reservatório para a infecção pelo HDV. Este reservatório é suportado por dois conjuntos diferentes de pacientes infectados. Um destes conjuntos consiste nos pacientes que sobreviveram à epidemia da década de 70, o outro é composto por uma população mais jovem, com infecções recentes, que migrou (e continua a migrar)

para a Europa, a partir de áreas onde o HDV permanece endêmico (Wedmeyer e Manns, 2010).

Em Portugal, não se conhecem dados recentes relativamente à prevalência do HDV. Os últimos estudos realizados, em 1987, apontavam para uma prevalência de aproximadamente 17% em portadores crónicos de HBsAg (Ramalho *et al.*, 1987).

O genótipo do HDV é um factor que pode influenciar o curso da hepatite delta. Deste modo, a determinação do genótipo pode facilitar a identificação dos pacientes com maior risco de desenvolver formas mais graves da doença (Su *et al.*, 2006). Actualmente, os conhecimentos relativos à variabilidade genética do HDV permitem dividi-lo em oito genótipos diferentes (Dény, 2006). O genótipo I é o mais frequente e encontra-se associado a um espectro alargado de patogenicidade. (Su *et al.*, 2006). Os genótipos II e IV ocorrem no Extremo Oriente e causam uma forma da doença relativamente moderada (Wu, 2006). O genótipo III encontra-se associado ao desenvolvimento de hepatites fulminantes na América do Sul (Smedile *et al.*, 1994). Por último, os genótipos V a VIII têm sido identificados principalmente em pacientes africanos (Makuwa *et al.*, 2009).

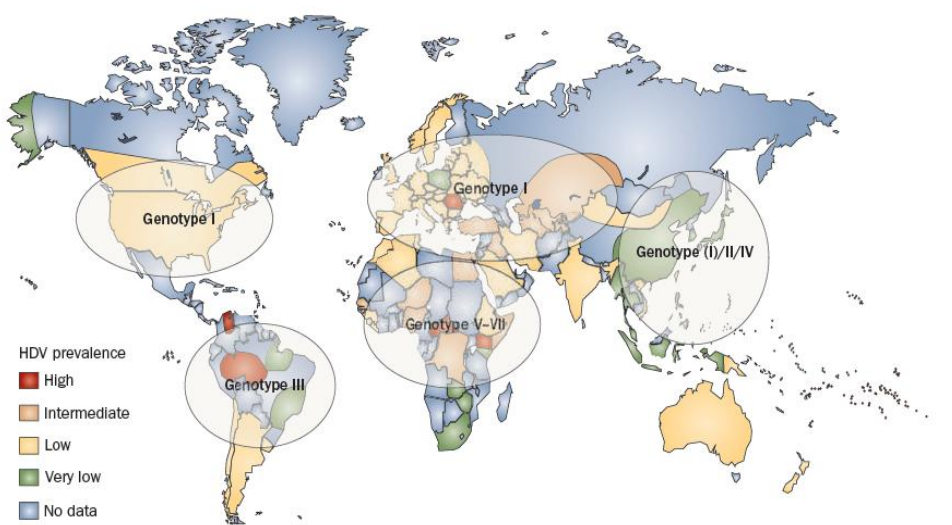


Figura I.1.2.1: Epidemiologia global da infecção pelo HDV de acordo com o genótipo viral. O genótipo I do HDV é o mais frequente e encontra-se distribuído mundialmente, principalmente na Europa, Médio Oriente, América do Norte. O genótipo II do HDV é observado na Ásia Oriental e o genótipo III ocorre exclusivamente na América do Sul. (adaptado de Wedmeyer e Manns, 2010).

I.1.3 TRATAMENTO E PREVENÇÃO

A gravidade do quadro clínico associado à hepatite delta e as particularidades do HDV, nomeadamente a ausência de uma função enzimática específica, tornam este vírus, um alvo

difícil para a terapêutica antiviral. Não existe, actualmente, um tratamento específico para a hepatite delta.

O interferão- α (INF- α) é a única opção terapêutica disponível para o tratamento da doença. Começou a ser utilizado na década de 90, revelando efeitos benéficos no tratamento de pacientes com hepatite delta crónica. No entanto, a sua eficácia está longe do pretendido. O tratamento padrão com INF- α , aplicado durante um ano, permitiu a remissão da hepatite delta crónica em cerca de 25% dos pacientes mas as taxas de eliminação de RNA de HDV são reduzidas (Niro *et al.*, 2005). Aparentemente, obtêm-se melhores resultados com um calendário mais agressivo e doses mais elevadas de INF- α , ainda que o prolongamento da terapia até dois anos não melhore a resposta relativamente ao tratamento de apenas 1 ano (Yurdaydin *et al.*, 2007).

Entretanto, começou a ser analisada uma nova terapia que consiste na utilização de interferão conjugado com polietileno glicol (INF-PEG). Os resultados obtidos com esta abordagem terapêutica foram mais animadores do que com o INF- α . O estudo clínico realizado por Castelnau e colaboradores revelou que 43% dos pacientes (num total de 14) com hepatite delta crónica, tratados com INF-PEG semanalmente, durante um ano, atingiram níveis inferiores de RNA de HDV no soro (Castelnau *et al.*, 2006). Contudo, em dois outros grupos de pacientes tratados com a mesma dosagem de INF-PEG, apenas se obteve uma resposta virológica sustentada em 17% (Erhardt *et al.*, 2006) e 21% dos pacientes (Niro *et al.*, 2006).

Na maioria dos pacientes com HDV, a replicação do HBV é reprimida. Contudo, alguns agentes antivirais, incluindo famciclovir, lamivudina e adefovir, que não mostraram eficácia na inibição da replicação do HDV, mas são activos contra o HBV, foram utilizados em monoterapia ou em combinação com o INF. Com esta abordagem pretendeu-se diminuir o nível de replicação do HBV e privar totalmente o HDV da função auxiliar do HBV. De um modo geral, estes agentes antivirais, mesmo em combinação com o INF não se mostraram mais eficazes do que o INF- α sozinho (Yurdaydin *et al.*, 2008).

Alguns alvos potenciais de novas terapias podem residir no processo de empacotamento do virião do HDV, uma vez que evidências sugerem a existência de locais, nas HBsAg, essenciais para maturação do HDV (Abou-Jaoudé e Sureau, 2007). Nomeadamente, as interacções dos HDAGs com os HBsAg ficam impedidas de ocorrer perante a substituição de resíduos de fenilalanina por resíduos de triptofano nas posições 196, 199 ou 201 da forma pequena dos HBsAg (S-HBsAg; Komla-Soukha e Sureau, 2006). Também, a prenilação de um resíduo de

cisteína presente na extremidade carboxílica da L-HDAg é crítica para a sua interacção com as proteínas do envelope de HBV (Glenn, 2006). A prevenção da associação das partículas de HDV com os HBsAgs pode impedir a formação de partículas virais de HDV. Assim, a inibição da prenilação pode representar a base de uma nova estratégia terapêutica contra o HDV. Experiências *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a eficácia de alguns inibidores, tais como FTI-277 e FTI-2153, na prenilação da L-HDAg. Nomeadamente, tendo sido utilizado o modelo de murganho para testar esta abordagem terapêutica, observou-se uma redução acentuada da produção de partículas virais infecciosas de HDV (Bordier *et al.*, 2003).

Em resumo, actualmente, não existe nenhuma terapia disponível que seja consistentemente eficaz no tratamento da hepatite delta. Neste contexto, a prevenção da infecção pelo HDV, através da vacinação contra o HBV, é a abordagem mais aconselhada para prevenir igualmente a infecção por HDV. Paralelamente, têm sido realizados esforços no sentido de desenvolver uma vacina eficaz na prevenção da infecção pelo HDV, para indivíduos cronicamente infectados pelo HBV.

Até à data, tem sido utilizada maioritariamente a marmota cronicamente infectada pelo vírus da hepatite da marmota, como modelo animal em testes de vacinação (Fiedler e Roggendorf, 2001). Tanto a utilização directa de HDAg como vacina, como a imunização recorrendo a vacinas de DNA que codificam para o HDAg não demonstraram possuir capacidade de induzir imunidade protectora contra a infecção pelo HDV (Fiedler e Roggendorf, 2006). Uma vez que as principais vias de transmissão consistem no contacto com sangue e com fluidos genitais, as medidas mais importantes para prevenir a infecção pelo HDV consistem na abstinência de comportamentos de risco, tais como relações sexuais desprotegidas ou partilha de seringas (Huo *et al.*, 1993).

I.1.4 BIOLOGIA

I.1.4.1 O AGENTE VIRAL

O HDV não se assemelha com nenhum outro vírus animal conhecido, mas possui algumas homologias com os viróides de plantas, no que respeita a características estruturais do genoma e mecanismos de replicação viral (revisto em Taylor, 1996).

O virião do HDV consiste numa partícula esférica com cerca de 36 nm de diâmetro, que apresenta um invólucro viral composto pelos HBsAgs e por lípidos celulares (Bonino *et al.*,

1986; He *et al.*, 1989). A parte interna do virião compreende uma porção ribonucleoproteica composta pelo genoma viral e múltiplas cópias do HDAG (Ryu *et al.*, 1993).

O genoma viral possui aproximadamente 1700 nts e consiste numa molécula de RNA circular, de cadeia simples e polaridade negativa, o RNA genómico. A molécula de RNA genómico, possuindo um elevado grau de emparelhamento intra-molecular de bases adquire, em condições nativas, uma estrutura em forma de bastonete (figura I.1.4.1; Kos *et al.*, 1986). Por definição, consideram-se moléculas de RNA genómico as moléculas que são incorporadas em novas partículas virais. No interior de células infectadas pelo HDV, encontram-se também outras moléculas de RNA viral, que constituem o RNA antigenómico. As moléculas de RNA antigenómico são produzidas no interior da célula hospedeira, como consequência da replicação do HDV. Partilham todas as características do RNA genómico, exceptuando o facto de lhe serem exactamente complementares. Ao contrário do RNA genómico, o RNA antigenómico não é empacotado nas partículas virais e encontra-se na célula hospedeira em níveis inferiores, sendo que existem cerca de 50000 cópias de RNA antigenómico comparativamente a 300000 cópias de RNA genómico (Chen *et al.*, 1986).

Apesar do genoma do HDV ser cerca de quatro vezes superior ao dos viróides de plantas, a estrutura de cadeia semi-dupla, apresentada por ambos, é muito semelhante. O HDV também possui domínios de ribozima, em ambas as cadeias genómicas e antigenómicas, que são necessárias para a clivagem das respectivas cadeias de RNA durante a replicação (figura I.1.4.1; Kuo *et al.*, 1988; Macnaughton *et al.*, 1993). Esta é outra característica partilhada pelo RNA de HDV e pelos viróides das plantas.

Contrariamente ao genoma dos viróides, o genoma do HDV contém, no RNA antigenómico, uma grelha de leitura aberta (ORF) responsável pela produção de HDAGs (Chen *et al.*, 1986). Durante a replicação do HDV, são transcritos, a partir do RNA genómico, mRNAs com cerca de 800 nt que codificam para os HDAGs (Hsieh *et al.*, 1990).

Ainda que o RNA do HDV possua uma única ORF, existem duas formas distintas de HDAGs, a forma pequena, com 195 resíduos de aa (S-HDAG; 24 kDa) e a forma grande com 214 (L-HDAG; 27 kDa). As sequências peptídicas são idênticas, com excepção de uma sequência de 19 aa que a L-HDAG possui adicionalmente, na extremidade C-terminal. Esta extensão da L-HDAG resulta da ocorrência de um mecanismo específico de *editing* de RNA no codão de terminação da ORF, numa fase mais fase tardia da replicação viral (Wong e Lazinski, 2002). Durante o *editing*, o codão de terminação UAG é convertido num codão triptofano UGG, estendendo a ORF por 19 aa adicionais (Taylor, 1992; Monjardino e Lai, 1993).

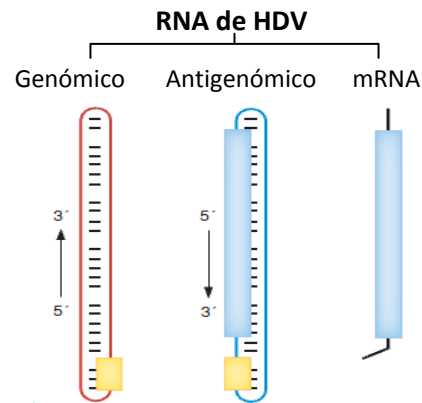


Figura I.1.4.1: Representação esquemática das três espécies de RNA resultantes da replicação do HDV. O RNA genômico encontra-se empacotado nas partículas virais de HDV e o RNA antigenômico é o seu exacto complementar. Ambos possuem cerca de 1700 nts de comprimento, têm conformação circular e adquirem estrutura em forma de bastonete. Tanto o RNA genômico como o antigenômico contêm um domínio de ribozima com cerca de 85 nts (rectângulo amarelo). O RNA antigenômico possui ainda uma ORF para o HDAg (rectângulo azul), no entanto, esta proteína é traduzida a partir de uma terceira espécie de RNA, o mRNA. O mRNA de HDV é linear, com cerca de 800 nt, e possui um estrutura *cap* e uma cauda poli(A), nas extremidades 5' e 3', respectivamente. (adaptado de Taylor e Pelchat, 2010).

As duas isoformas partilham vários domínios funcionais, incluindo domínios de ligação ao RNA (RBD), um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de oligomerização (OLIG) que permite a multimerização de HDAGs (figura I.1.4.2; Lee *et al.*, 1993). A L-HDAg apresenta ainda, nos 19 aa adicionais da extremidade carboxílica, um sinal de isoprenilação (PREN) e um eventual sinal de exportação nuclear (NES, Lee *et al.*, 2001). Apesar das semelhanças ao nível de domínios estruturais, as duas proteínas exibem funções diferentes no ciclo de replicação do HDV. A S-HDAg é necessária para a replicação do RNA (Kuo *et al.*, 1988), enquanto a L-HDAg inibe a replicação e é necessária para o empacotamento de partículas virais (Chang *et al.*, 1991; Ryo *et al.*, 1992). Consequentemente, o sinal para empacotamento viral está situado nos 19 aa da extremidade C-terminal da L-HDAg.

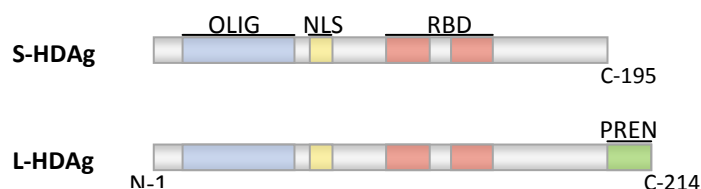


Figura I.1.4.2: Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em S-HDAg e L-HDAg. Na região N-terminal, ambas as proteínas contêm um domínio de oligomerização (OLIG; aa 12-60). Segue-se um domínio de sinalização nuclear (NLS; aa 66-75) e na região central/C-terminal foi identificado um domínio de ligação a RNA bipartido (RBD; aa 97-143). A L-HDAg apresenta ainda, na sequência adicional de 19 aa, um sinal de isoprenilação (PREN) (adaptado de Cunha *et al.*, 2003).

I.1.4.2 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HDV

I.1.4.2.1 ENTRADA DO VÍRUS NA CÉLULA HOSPEDEIRA E DESEMPACOTAMENTO

O envelope viral do HDV é composto pelos HBsAgs. Os dois vírus possuem, portanto, invólucros virais semelhantes, pelo que se admite que utilizam os mesmos receptores para entrar na célula hospedeira (Sureau *et al.*, 1993). No entanto, os receptores celulares que medeiam a entrada do HDV nos hepatócitos ainda não foram identificados.

Os HBsAgs encontram-se divididos em três tipos, de acordo com as suas dimensões: pequenas (S-HBsAg), médias (M-HBsAg) e grandes (L-HBsAg; Bruss e Ganem, 1991). Ainda que não se conheçam os receptores celulares, sabe-se que a L-HBsAg apresenta uma região, denominada preS1, que compreende sequências essenciais para a ligação e entrada dos dois vírus em células hepáticas (Engelke *et al.*, 2006; Urban, 2008). Por sua vez, estudos efectuados por Abou-Jaoudé e colaboradores sugerem que, para além da sequência preS1, existe um outro local nos HBsAgs que é determinante para a infectividade do HDV (Abou-Jaoudé e Sureau, 2005).

I.1.4.2.2 SÍNTESE DE RNA

Pelo facto do genoma do HDV codificar para apenas uma proteína, pressupõe-se que as etapas de transcrição e replicação viral estejam fortemente dependentes das funções biológicas do hospedeiro.

Após a entrada na célula hospedeira, as ribonucleoproteínas (RNPs) virais são direccionadas para o núcleo, onde tem lugar a transcrição e replicação viral. Esta interpretação tem por base o facto dos HDAs e RNAs do HDV e se encontrarem predominantemente localizados no núcleo (Cunha *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2000). Admite-se que a etapa de transporte nuclear é mediada pelos HDAs nas RNPs presentes nas partículas virais, face à presença de um domínio funcional NLS (Sheu e Lai, 2000; Tavanetz *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 1998).

Muitas das evidências disponíveis suportam a hipótese de que o genoma de RNA do HDV é replicado por um mecanismo de círculo rolante duplo (Kuo *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1986; Macnaughton *et al.*, 2002), semelhante ao proposto para os viróides de plantas (Branch e Robertson, 1984). Neste modelo, o RNA genómico é utilizado como molde para a síntese de RNAs antígenómicos multiméricos. As moléculas antígenómicas nascentes utilizam a sua actividade ribozímica para auto-clivarem o RNA em monómeros (Kuo *et al.*, 1988; Macnaughton *et al.*, 1993). Posteriormente, estes monómeros são ligados pela acção de uma ligase de RNA celular, obtendo-se moléculas circulares (Reid e Lazinski, 2000). Em

seguida, os monómeros circulares de RNA antigenómico servem de molde para a segunda ronda da replicação por círculo rolante, permitindo a produção de monómeros de RNA genómico circular.

O modelo de replicação de círculo rolante duplo, descrito anteriormente, apresenta uma limitação importante. Apenas explica a síntese de RNA genómico e antigenómico, não contemplando a produção do mRNA que codifica para o HDAg (figura I.1.4.1). Este mRNA corresponde a cerca de 0.8 kb do RNA antigenómico e possui todas as características de um mRNA celular (com *cap* e cauda poli(A)). Assim, de um modo distinto do observado para os viróides, a replicação do HDV tem de englobar a transcrição deste mRNA, em coordenação com a síntese de RNA genómico e antigenómico. De modo a incluir a transcrição de mRNA no ciclo de replicação do HDV, foram introduzidas alterações ao mecanismo de círculo rolante. Hsieh e Taylor propuseram que os processos de transcrição e replicação encontram-se separados temporalmente. De acordo com estes autores, a síntese de mRNA é o evento inicial na replicação do HDV e mantém-se até que o sinal de poliadenilação seja silenciado. Nestas condições, é possível a continuação da síntese de RNA para além do local de inserção da cauda poli(A), obtendo-se transcritos antigenómicos multiméricos que são processados, tal como descrito anteriormente, para obtenção de moléculas antigenómicas circulares (Hsieh e Taylor, 1991).

Apesar da introdução destas alterações, o modelo resultante continua a apresentar sérias limitações, na medida em que, a síntese de mRNA, ocorrendo apenas na fase inicial da replicação não permite a produção de L-HDAg. Note-se que, neste modelo, os RNAs que servem de molde à síntese de mRNAs codificantes para a L-HDAg surgem apenas numa fase mais tardia do ciclo de replicação do HDV, resultando de um mecanismo de *editing* do RNA. Deste modo, sendo a presença da L-HDAg fundamental para a montagem de partículas virais, o modelo proposto não é compatível com um ciclo de replicação produtivo. Em alternativa, os estudos de Modahl e Lai suportam outra hipótese, em que a síntese de mRNA e a replicação do genoma de HDV são processos independentes. Estes autores demonstraram que a síntese de mRNA e RNA antigenómico ocorrem em paralelo e sugeriram o envolvimento de complexos de transcrição e de replicação independentes (Modahl e Lai, 1998).

Para além das opiniões controversas acerca do modelo proposto para a replicação do HDV, o envolvimento de diferentes polimerases celulares na replicação também tem sido alvo de opiniões divergentes. A RNA polimerase II foi, desde cedo, implicada na replicação do HDV

(Fu e Taylor, 1993). Admite-se que o HDV possui uma capacidade invulgar de redireccionar essa enzima que, regularmente, depende de DNA para transcrever genomas virais (Fu e Taylor, 1993). Estudos baseados em resistência a α -amanitina, conhecida por bloquear a transcrição mediada pela RNA polimerase II, confirmaram uma função essencial da RNA polimerase II na replicação do RNA de HDV (Macnaughton *et al.*, 2002; Chang e Taylor, 2002).

Parece ser consensual, entre a comunidade científica, que a RNA polimerase II é a enzima responsável pela transcrição de mRNA codificante para a HDAg e pela síntese de moléculas de RNA genómico (Fu e Taylor 1993; Modahl *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002; Chang e Taylor, 2002; Chang *et al.*, 2008). No que respeita à identidade da enzima responsável pela produção de moléculas de RNA antigenómico, o mesmo não se verifica. Alguns grupos defendem que a RNA polimerase II é a única enzima envolvida na replicação e transcrição do HDV. Em ensaios de *run-on* na presença de α -amanitina, foi possível verificar que a presença deste inibidor da RNA polimerase II, provoca uma redução drástica na síntese de RNA antigenómico (Chang *et al.*, 2008). Também, por intermédio de técnicas de imunoprecipitação, foi demonstrado que a RNA polimerase II interage com sequências de RNA antigenómico do HDV (Greco-Stewart *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que, à semelhança do que se verifica para o RNA genómico e mRNA, também a síntese de RNA antigenómico é conduzida pela RNA polimerase II. Contrariamente, outros autores consideram plausível admitir que uma enzima celular diferente (a RNA polimerase I ou III), é responsável pela síntese do RNA antigenómico (Mohdal *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002). Os estudos de Li e colaboradores mostraram que a síntese de RNA genómico é sensível a α -amanitina e ocorre no nucleoplasma em associação com os corpos PML, enquanto a síntese do RNA antigenómico é resistente a α -amanitina e ocorre na periferia do nucléolo. Ainda, estes autores observaram que a utilização de um anticorpo específico contra um factor de iniciação da RNA polimerase I, SL1, reduz a síntese de RNA antigenómico em cerca de 80% (Li *et al.*, 2006). Foi também demonstrada a interacção de ambas as RNA polimerases I e III com RNA genómico e antigenómico de HDV, tanto em condições *in vitro* como em células humanas (Greco-Stewart *et al.*, 2009). Tendo em conta estes resultados, a hipótese da contribuição de polimerases adicionais, diferentes da RNA polimerase II, na replicação do HDV, é cada vez mais apoiada. De facto, a actuação de diferentes polimerases celulares na síntese de RNA genómico e antigenómico explicaria vários aspectos no ciclo de vida do HDV. Por exemplo, o RNA genómico é constantemente exportado para o citoplasma

de modo a ser empacotado, enquanto o RNA antígenómico apenas é exportado na fase inicial da infecção (Macnaughton *et al.*, 2002). Dado que a transcrição mediada pela RNA polimerase II se encontra associada à maquinaria de exportação nuclear (Cullen, 2003), o seu envolvimento na síntese de RNA genómico e mRNA, justificaria a exportação destes imediatamente a seguir à sua síntese.

É de salientar que a presença da S-HDAg é condição indispensável para a iniciação do processo de replicação. Estudos *in vivo* e *in vitro*, têm suportado a ideia de que esta proteína actua como uma chaperona do RNA, facilitando as clivagens e ligações realizadas pelos domínios ribozima do RNA de HDV (Jeng *et al.*, 1996; Huang e Wu, 1998). Igualmente, a capacidade que a S-HDAg apresenta para se ligar especificamente ao RNA do HDV, assim como a presença de um NLS, parecem ser aspectos fundamentais durante o transporte do genoma do HDV para o núcleo onde irá ocorrer a replicação (Gowans *et al.*, 1988).

A S-HDAg também pode ser alvo de modificações pós-transcricionais tais como metilação, acetilação ou fosforilação. A metilação da arginina 13, acetilação da lisina 72 e fosforilação da serina 177 são as principais modificações da S-HDAg e são importantes para as suas funções na replicação do RNA viral, nomeadamente, as formas modificadas e não modificadas da S-HDAg encontram-se envolvidas em diferentes etapas da replicação de RNA (Mu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2008).

Encontra-se bem documentado que a S-HDAg interage com diversos factores celulares. Nestes incluem-se o factor de transcrição YY1, a histona H1, a proteína nucleolar B23, entre outros. Na sua maioria, estes factores celulares parecem modular de certo modo a replicação do HDV (revisto em Greco-Stewart e Pelchat, 2010).

1.1.4.2.3 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS

Ao contrário da S-HDAg, a L-HDAg é um supressor dominante da replicação do HDV (Chao *et al.*, 1990). Sabe-se também que a L-HDAg é indispensável para o empacotamento e montagem de partículas virais (Chang *et al.*, 1991).

Na fase tardia do ciclo viral do HDV, as RNPs são exportadas para o citoplasma (Tavanez *et al.*, 2002). Foi previamente demonstrado que a L-HDAg é uma proteína que efectua um tráfego nucleocitoplasmático constante e possui um NES, localizado na extremidade C-terminal. Na presença de HBsAgs, uma elevada percentagem de L-HDAg encontra-se localizada no citoplasma, o mesmo não acontecendo com a S-HDAg. Deste modo, foi sugerido que o NES da L-HDAg lhe confere a função de exportação nuclear e permite que o

RNA genómico e a S-HDAg, em complexos ribonucleoproteicos, sejam transportados para o citoplasma (Lee *et al.*, 2001). Uma vez no citoplasma e, na ausência de infecção pelo HBV, as RNPs do HDV são rapidamente reimportadas para o núcleo, devido à existência de um NLS nos HDAGs. No caso de haver infecção pelo HBV, as RNPs interagem com as HBsAgs no retículo endoplasmático, formando partículas virais de HDV, que acabam por ser secretadas da célula hospedeira, propagando a infecção (Tavanez *et al.*, 2002).

Quanto ao empacotamento de partículas virais, não é ainda totalmente claro como ocorre a interacção entre as RNPs do HDV e as HBsAgs. No entanto, sabe-se que a prenitação da cisteína 211, na L-HDAg é condição necessária, mas não suficiente, para a interacção com HBsAgs (Glenn *et al.*, 1992; Hwang e Lai, 1993).

I.1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cerca de trinta anos após a descoberta do HDV (Rizzetto *et al.*, 1977), a sua caracterização tem revelado propriedades invulgares entre os agentes patogénicos humanos conhecidos. Aqui se incluem a sua dimensão reduzida, a actividade ribozímica, a necessidade do HDV como vírus auxiliar, a utilização de um mecanismo de círculo rolante para a replicação, entre outras (revisto em Rizzetto, 2009).

Algumas das propriedades particulares do HDV têm vindo a assumir particular importância, dada a possibilidade de virem a ser utilizadas como potenciais ferramentas terapêuticas. Este é o caso da actividade autocatalítica de ribozima (Kuo *et al.*, 1988). As ribozimas têm revelado um elevado potencial terapêutico, pelo facto de clivarem RNAs prejudiciais ao correcto funcionamento das células. As propriedades das ribozimas têm sido intensamente exploradas na tentativa de virem a constituir uma possível terapia génica, nomeadamente em doenças para as quais não existe tratamento específico, como tumores e doenças virais. A ribozima do HDV é a única, entre os vírus que infectam humanos, que possui naturalmente actividade catalítica de clivagem de RNAs em humanos. Assim, possivelmente será mais estável do que as ribozimas de origem não humana, podendo ser menos reconhecida pelo sistema imunitário. Neste sentido, a sua utilização no desenvolvimento de sistemas para inactivação génica, tem sido explorada (Asif-Ullah *et al.*, 2007).

O possível envolvimento de várias polimerases de RNA celulares na replicação do HDV, já discutido anteriormente, sugeriu que o nível de complexidade da biologia do HDV é superior ao inicialmente admitido. Este facto pressupõe que o HDV está muito dependente das maquinarias enzimáticas celulares. O estudo da contribuição de proteínas do hospedeiro, no

ciclo de replicação do HDV, pode também contribuir para o esclarecimento das funções celulares destas proteínas. Assim, a análise das interacções realizadas entre o HDV e as proteínas do hospedeiro assume um elevado interesse científico.

Apesar do número crescente de factores celulares descritos como interactores dos HDAGs e dos RNAs de HDV, a maioria da função destas interacções não foi ainda elucidada e muitas etapas do ciclo de replicação viral permanecem pouco claras (Greco-Stewart e Pelchat, 2010). Neste sentido, é muito provável que um número considerável de factores celulares permaneça ainda por identificar. A identificação destes factores, e o esclarecimento da sua contribuição na replicação e patogénese do HDV, será fundamental para a compreensão da sua biologia assim como dos aspectos que o tornam um vírus ímpar entre os patógenos humanos.

I.1.6 OBJECTIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objectivos:

- Identificar proteínas celulares capazes de interagir com os HDAGs;
- Esclarecer a função biológica das proteínas identificadas no ciclo de replicação do HDV.

CAPÍTULO II

Pesquisa de interacções entre os HDAGs e proteínas de fígado humano, pelo sistema *yeast two hybrid*

II.1 INTRODUÇÃO

As interações entre proteínas assumem um papel fundamental em quase todos os processos biológicos, desde a replicação de DNA, transcrição, poliadenilação, *splicing*, transporte ou tradução. Actualmente, estima-se que mais de 80% das proteínas operam em complexos proteicos (Berggård *et al.*, 2007), sugerindo que a identificação das interações proteicas que uma determinada proteína é capaz de realizar, pode contribuir para o estudo da sua função.

As interações entre proteínas podem ser analisadas por técnicas bioquímicas tradicionais como a cromatografia de exclusão molecular, a cromatografia de afinidade ou a imunoprecipitação (Phizicky e Fields, 1995), sendo que estas ferramentas não são adequadas para a análise de interações em larga escala. O sistema *yeast two-hybrid* (YTH), é um dos métodos mais utilizados na identificação de interações entre proteínas (Berggård *et al.*, 2007), principalmente por ser simples de implementar e por constituir uma boa aproximação ao ambiente *in vivo* dos seres eucarióticos superiores (Van Criekeing e Beyaert, 1999).

II.1.1 PRINCÍPIOS DO SISTEMA YTH

A técnica de YTH foi estabelecida em 1989, por Fields e Song (Fields e Song, 1989). O conceito básico surgiu de experiências prévias que provaram que, em leveduras, os factores de transcrição eram compostos por dois domínios funcionais distintos: um domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), que reconhece uma sequência específica no promotor de alguns genes, e um domínio de activação da transcrição (AD), que recruta as proteínas necessárias para a transcrição desse gene (Brent e Ptashne, 1985; Ma e Ptashne, 1989). Esta propriedade foi intensamente explorada para permitir a detecção de interações entre proteínas, de tal modo que, por técnicas de DNA recombinante, os dois domínios podem ser expressos como fusões com outras proteínas, cuja capacidade de interacção se pretende testar. Quando estas duas proteínas interagem, aproximam os dois domínios funcionais, e a sua proximidade viabiliza a transcrição de genes que possuam no seu promotor uma sequência nucleotídica reconhecida pelo DNA-BD da proteína de fusão (figura II.1.1.1).

Na prática, o sistema YTH necessita de três ferramentas: um plasmídeo que codifica para o DNA-BD, outro plasmídeo codificante para o AD e uma estirpe de levedura que possua genes cuja transcrição possa ser activada por esse factor de transcrição. Para avaliar a interacção

entre duas proteínas, o gene de uma proteína em estudo (proteína isco), é clonado em grelha com o DNA-BD, e o gene que codifica outra proteína de interesse, à qual a proteína isco se possa ligar (proteína alvo), é clonado em grelha com o AD. Ambos os plasmídeos, resultantes da clonagem, são transformados numa estirpe de levedura apropriada, de tal modo que a proteína isco é expressa como uma fusão com o DNA-BD, localizando-se no promotor de um gene repórter, no núcleo da célula, e a proteína alvo é expressa como uma fusão com o AD. Na presença de uma interacção entre as duas proteínas, os dois domínios funcionais do factor de transcrição tornam-se fisicamente próximos, viabilizando a transcrição de genes cuja transcrição é activada pela sua reconstituição (Fields e Song, 1989). A estes genes, dá-se o nome de genes repórteres, por permitirem distinguir as colónias de levedura onde ocorre a interacção entre as duas proteínas de fusão, por exemplo, pelo desenvolvimento de uma cor, resultante da síntese de um produto duma reacção enzimática, ou pela capacidade de crescimento num meio selectivo (Mount *et al.*, 1996).

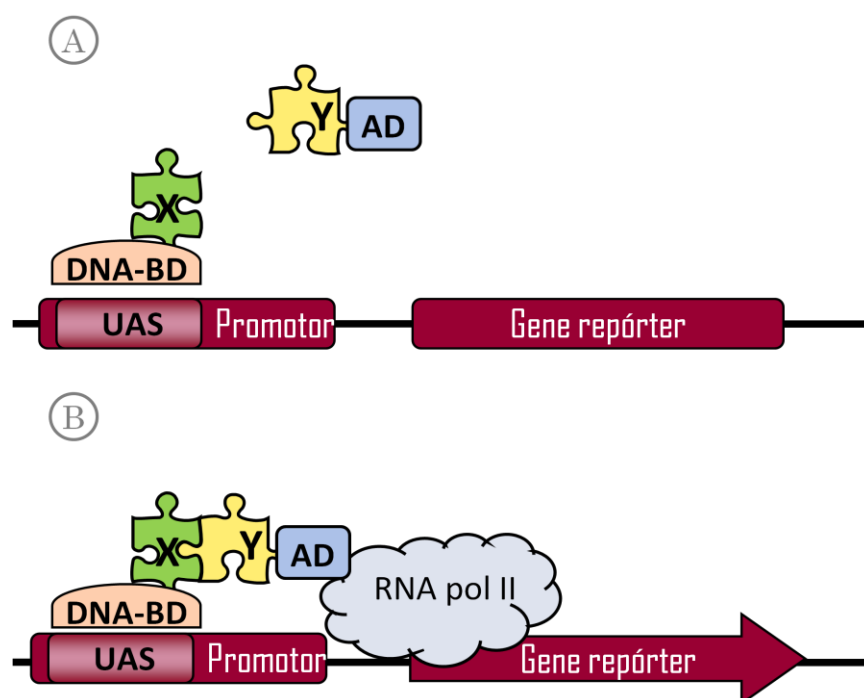


Figura II.1.1.1: O sistema *yeast two hybrid* clássico. (A) Uma proteína de interesse X é expressa como fusão com um domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), constituindo a proteína isco. Uma proteína Y, potencial interactor da proteína X, é expressa como fusão com um domínio de activação da transcrição (AD), constituindo a proteína alvo. **(B)** A proteína isco, DNA-BD/X, liga-se na sequência de activação a montante do promotor (UAS) e a interacção com a proteína alvo, AD/Y, recruta o AD reconstituindo um factor de transcrição que, por sua vez, recruta a RNA polimerase II, iniciando-se a transcrição de um gene repórter (adaptado de Brückner *et al.*, 2009).

II.1.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA YTH

Desde a sua criação, o sistema YTH, tem evoluído de numerosos modos permitindo melhorar a sua tecnologia e tornando-o mais adequado para os utilizadores.

O sistema YTH descrito por Fields e Song baseava-se nas propriedades do factor de transcrição GAL4 de levedura (Fields e Song, 1989). Alguns anos mais tarde, foi desenvolvido um sistema semelhante em que, o factor GAL4 era substituído pelo DNA-BD de uma proteína repressora de bactérias (LexA) em combinação com o AD da proteína B42 de *E. coli* (Gyuris *et al.*, 1993). Actualmente, sistemas baseados em diferentes factores de transcrição encontram-se comercialmente disponíveis (Clontech, Invitrogen, etc.) e a escolha de um deles é meramente pessoal.

Inicialmente, o sistema YTH tinha como aplicação principal testar a interacção entre duas proteínas específicas. À medida que o sistema foi sendo utilizado com sucesso, surgiu a hipótese de utilizá-lo para identificar novas interacções, por intermédio de uma biblioteca de proteínas expressas como fusão com o AD. Chien e colaboradores provaram que este tipo de procedimento era possível (Chien *et al.*; 1991), abrindo caminho para a utilização do sistema YTH na identificação de interacções entre proteínas de quaisquer organismos e envolvidas em variados processos biológicos (Fields, 2005). Por outro lado, também o desenvolvimento de estirpes de leveduras haplóides veio dar um grande contributo para evolução da técnica. A conjugação de estirpes haplóides de leveduras, de tipos opostos (*MATa* ou *MATα*), simplificou muito a análise das interacções de números elevados de proteínas. Os plasmídeos isco podem assim ser transformados numa estirpe de levedura de um determinado tipo de conjugação e os plasmídeos alvo numa estirpe do tipo de conjugação oposto, procedendo-se, em seguida, à conjugação das duas estirpes. Além de tornar o procedimento mais simples, facilitando a realização de ensaios em larga escala, a conjugação de leveduras de tipo oposto também tornou a pesquisa mais sensível, permitindo identificar interacções que não eram detectadas por procedimentos de cotransformação (Uetz *et al.*, 2000).

No sistema clássico (Fields e Song; 1989), o gene *lacZ*, que codifica a proteína β-galactosidase, foi o único gene repórter utilizado. A actividade deste gene pode ser avaliada pela adição de um substrato da β-galactosidase, o 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-β-Gal), uma vez que a degradação deste substrato pela enzima, promove o aparecimento de um composto de cor azul (Breen e Nasmith, 1985). Na tentativa de

minimizar o aparecimento de falsos positivos, foram criadas estirpes de levedura na posse de vários genes repórteres. A activação dos genes repórteres pode ser avaliada pelo aparecimento de colónias de uma cor específica (como é o caso do gene *lacZ*), ou pelo crescimento de colónias em condições restritivas, em estirpes de levedura auxotróficas. Genes repórteres tais como *HIS3*, *LEU2*, *ADE2* ou *MEL1*, são actualmente utilizados, em combinação, para permitir uma análise mais restrigente das interacções (Causier e Davies, 2002). Por sua vez, a detecção da activação dos próprios genes repórteres também tem sido alvo de melhoramentos (revisto em Vidalain *et al.*, 2004; Koegl e Uetz, 2008). Por exemplo, no caso particular do gene *HIS3*, o ensaio pode ser optimizado para reduzir o número de falsos positivos, pela adição de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) no meio de crescimento. O 3-AT é um inibidor competitivo do produto do gene *HIS3*, pelo que reduz a expressão basal deste gene que ocorre com alguma frequência nos ensaios YTH (Causier e Davies, 2002).

II.1.3 LIMITAÇÕES DO SISTEMA YTH

O sistema YTH oferece diversas vantagens relativamente a outros métodos bioquímicos, nomeadamente o custo, a simplicidade e a sensibilidade. Ainda assim existem alguns problemas que lhe têm vindo a ser associados.

Admite-se que a principal desvantagem do sistema consiste no elevado número de falsos positivos. Numa análise crítica sobre o método YTH, aplicada em ensaios de grande escala, estimou-se que cerca de 50% das interacções detectadas são falsos positivos. (von Mering *et al.*, 2002).

Podem distinguir-se duas categorias de falsos positivos: o falso positivo “biológico” e o falso positivo “técnico”. No caso do falso positivo biológico, a interacção entre as duas proteínas ocorre no contexto do ensaio YTH, mas não se verifica *in vivo*, no organismo de interesse, por exemplo, pelo facto das proteínas intervenientes se localizarem em compartimentos celulares distintos. Por sua vez, o falso positivo técnico é causado por limitações do sistema, nomeadamente quando há activação de um gene repórter sem que ocorra interacção entre as proteínas alvo e isco, ou seja, quando uma proteína sozinha consegue iniciar a transcrição de um gene repórter (auto-activação). Se, por um lado, a redução do número de falsos positivos técnicos tem sido possível, nomeadamente pelo desenvolvimento de novos genes repórteres, já discutido anteriormente, utilização de vectores com número de cópias reduzidas ou a revalidação das interacções em levedura (Vidalain *et al.*, 2004), os falsos

positivos biológicos são praticamente impossíveis de eliminar e a sua identificação requer um conhecimento profundo das proteínas envolvidas.

Numa pesquisa por YTH, também é possível a ocorrência de falsos negativos, prevendo-se que a sua frequência seja na ordem de 70-90%, em sistemas YTH convencionais (Stellberger *et al.*, 2010). Este tipo de resultado tem origem no facto de determinadas interacções proteicas não serem passíveis de reprodução num ambiente YTH. Muitas vezes, os falsos negativos resultam da ausência de modificações pós-traducionais necessárias para a ocorrência de interacção (Ito *et al.*, 2001).

A ocorrência frequente de falsos negativos e positivos tem constituído um grande desafio para a utilização da técnica em ensaios de larga escala. Ainda assim, e apesar das limitações intrínsecas ao sistema YTH, vários resultados confirmam tratar-se de uma ferramenta útil na identificação de interacções entre proteínas. É, no entanto, indispensável, uma análise cuidadosa dos resultados sendo sempre fundamental averiguar o significado biológico das interacções detectadas.

II.1.4 SISTEMAS YTH ALTERNATIVOS

Em virtude das limitações presentes no sistema YTH convencional, muitas metodologias derivadas têm surgido, na tentativa de ultrapassar algumas destas limitações. Actualmente, estas metodologias alternativas permitem pesquisar interacções proteicas em quase todo o proteoma celular, incluindo proteínas membranares e citoplasmáticas (sistema *split-ubiquitin* ou o sistema de recrutamento SOS), proteínas extracelulares (SCINEX-P), factores de transcrição (sistema RTA) ou proteínas localizadas em compartimentos celulares distintos, alargando bastante as fronteiras da aplicabilidade da tecnologia (revisto em Brückner *et al.*, 2009).

Por outro lado, o sistema tem vindo a ser manipulado no sentido de serem utilizados organismos alternativos como hospedeiros. Surgiu assim a versão *mammalian two hybrid* (MTH), em que o hospedeiro no ensaio é constituído por células de mamífero. Mais uma vez, as proteínas em estudo são expressas como fusões com o DNA-BD e o AD, de um factor de transcrição e a sua interacção é detectada pela activação de um gene repórter, neste caso o gene que codifica para a proteína CAT, cuja expressão pode ser avaliada por métodos convencionais (Luo *et al.*, 1997). Este tipo de ensaio tem a grande vantagem das proteínas estudadas estarem sujeitas às modificações pós-traducionais, muitas vezes essenciais, para o estabelecimento de interacção. Desde o sistema proposto por Luo e colaboradores, novas

tecnologias MTH têm surgido, recorrendo a diferentes factores de transcrição e a diferentes genes repórteres, à semelhança do sucedido com o sistema YTH (Lievens *et al.*, 2009). No entanto, os procedimentos de MTH têm-se revelado difíceis de adaptar para ensaios em larga escala, pelo que a sua utilização tem sido limitada à confirmação de resultados previamente obtidos por YTH (Fiebitz *et al.*, 2008).

Existem também alguns sistemas *two-hybrid* que utilizam as bactérias com hospedeiro (Hays *et al.*, 2000; Joung *et al.*, 2000). As principais vantagens dos sistemas *bacterial two hybrid* (BTH) estão relacionadas com a possibilidade de rapidamente obter resultados e o potencial para aplicação em ensaios de larga escala, constituindo o ambiente procariótico em que se realizam, a maior das contrapartidas.

Outros dois conceitos de sistemas YTH são o sistema *yeast one-hybrid* (Wang e Reed, 1993) e RNA *yeast three-hybrid* (SenGupta *et al.*, 1996), que permitem a análise de interacções DNA-proteína e RNA-proteína, respectivamente. No caso específico do RNA *yeast three hybrid*, o sistema constitui uma ferramenta valiosa pois encontra-se entre os poucos métodos disponíveis capazes de identificar novas interacções entre RNA e proteínas *in vivo* (Bernstein *et al.*, 2002).

II.1.5 APLICAÇÕES DO SISTEMA YTH

O sistema YTH tem vindo a ser largamente utilizado em investigação nas mais diversas áreas e com múltiplos propósitos. Alguns anos após a primeira descrição do sistema por Fields e Song (Fields e Song, 1989), Li e Fields provaram que o sistema detectava a interacção entre a proteína p53 e o antígeno T grande do vírus símio 40 (SV40; Li e Fields, 1993) e, posteriormente, foi possível identificar mutações na proteína p53 que afectam a sua interacção com o antígeno T grande de SV40 (Iwabuchi *et al.*, 1994). Desde então, o sistema passou a ser utilizado, não só para detectar interacções entre proteínas, mas também para determinar os domínios proteicos necessários ao estabelecimento da interacção (McAlister-Henn *et al.*, 1999).

Actualmente, a utilização conjunta do sistema YTH com a técnica de cromatografia de afinidade seguida de espectrometria de massa (AP-MS; Puig *et al.*, 2001), tem facilitado a obtenção de informação sobre os mapas de interacções proteicas. Enquanto o sistema YTH permite detectar as interacções binárias, a AP-MS identifica componentes de agregados proteicos mais complexos. A combinação dos resultados obtidos por ambos os métodos

pode contribuir para o esclarecimento da dinâmica das interações proteicas (Gavin *et al.*, 2002; Scholtens *et al.*, 2005).

Por outro lado, vários ensaios YTH em larga escala, têm desempenhado um papel crucial no conhecimento do interactoma de diversos organismos, constituindo bons exemplos os resultados obtidos em *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), *Drosophila melanogaster* (Giot *et al.*, 2003), bacteriófago T7 (Bartel *et al.*, 1996) ou humano (Rual *et al.*, 2005). Nomeadamente, no caso de *S. cerevisiae*, milhares de interações já foram detectadas pelo sistema YTH e, pelo facto de muitos domínios estruturais serem conservados, as análises computacionais permitem prever interações proteicas em outros organismos (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Uetz e Stagljar, 2006).

Mais recentemente, os interactomas de vários vírus também têm sido alvo de intensos estudos, como é o caso dos vírus da família herpesvirus (Uetz *et al.*, 2006; Rozen *et al.*, 2008) ou do HCV (de Chassey *et al.*, 2008), entre outros (von Brunn *et al.*, 2008). A integração dos resultados obtidos para os diferentes vírus revelou que muitas das interações com os hospedeiros tendem a ser estabelecidas essencialmente com proteínas celulares participantes em extensas redes de interações e envolvidas em múltiplos processos celulares (Dyer *et al.*, 2008). Estas evidências levaram à sugestão de que existe um mecanismo conservado entre os sistemas virais para o controlo e manipulação eficientes dos processos celulares do hospedeiro (Peng *et al.*, 2009).

II.2 OBJECTIVOS

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo:

- Identificar eventuais proteínas celulares capazes de interagir com os HDAGs e com o domínio NLS presente nos HDAGs, recorrendo ao sistema YTH.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1 SISTEMA YTH

O sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid* (Clontech) foi utilizado para pesquisar interações entre as proteínas de interesse e uma biblioteca de cDNA de fígado humano (Clontech). Este sistema comercial baseia-se no factor de transcrição GAL4 e a detecção das interações proteicas é realizada pela activação de quatro genes repórteres distintos, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* e *lacZ*, sendo que este último é utilizado para quantificar a intensidade relativa das interações.

II.3.1.1 ESTIRPES DE LEVEDURA

As estirpes utilizadas, AH109 (Harper *et al.*, 1993) e Y187 (James *et al.*, 1996), ambas de *S. cerevisiae*, são de tipo de conjugação opostos (*MATa* e *MATα*), logo são parceiras adequadas para o processo de conjugação.

A estirpe de levedura AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*, *MEL1*) foi utilizada para a expressão das proteínas isco e a estirpe Y187 (*MATα*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *met-*, *gal80Δ*, *MEL1*, *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*) é a hospedeira da biblioteca de cDNA.

II.3.1.2 VECTORES

O vector utilizado para clonar o cDNA codificante para as proteínas a utilizar como isco foi o vector pAS2-1 (Clontech). Este vector permite a expressão de proteínas de fusão com os aa 1 a 147 do DNA-BD de GAL4. Este vector tem ainda outras características que o tornam apropriado para utilização no sistema YTH, nomeadamente possuir duas origens de replicação independentes, em bactéria e levedura, conferir resistência à ampicilina e cicloheximida e permitir o crescimento em meio de cultura deficiente no *aa* triptofano. Tem também um local múltiplo de clonagem (MCS) para inserção do fragmento de DNA em estudo.

O vector utilizado na preparação da biblioteca de cDNA de fígado humano, pGADT7-Rec, permite a expressão de proteínas de fusão com os aa 768 a 881 do AD de GAL4. O vector foi construído para permitir a construção de bibliotecas de cDNA, por recombinação homóloga em levedura. Este vector possui ainda origens de replicação independentes, em bactéria e

levedura, confere resistência à ampicilina e permite o crescimento em meio de cultura deficiente no aa leucina.

II.3.1.3 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS ISCO

Os plasmídeos pAS2-1/S-HDAg, pAS2-1/L-HDAg, pAS2-1/ext_L-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg foram construídos para serem utilizados no sistema YTH. Estes plasmídeos devem permitir a produção de proteínas de fusão constituídas pelo DNA-BD e pelas proteínas/sequências peptídicas, cujas interações se pretendem analisar. No caso de pAS2-1/S-HDAg e pAS2-1/L-HDAg as proteínas de interesse são a S-HDAg e L-HDAg, respectivamente, em pAS2-1/ext_L-HDAg, é a sequência de 19 aa adicionais que a L-HDAg possui em relação à S-HDAg e, em pAS2-1/3NLS-HDAg, é uma sequência polipeptídica constituída por três cópias em *tandem* do sinal de localização nuclear (NLS), previamente identificado no HDAg (Alves *et al.*, 2008).

Na construção dos plasmídeos pAS2-1/S-HDAg e pAS2-1/L-HDAg, as sequências do cDNA de ambas as formas dos HDAGs, foram obtidas por reacção da polimerase em cadeia (PCR), tendo sido utilizado como DNA molde, os plasmídeos pGEX-6P-2/S-HDAg (Mota e Cunha, 2003) e pSVL/L-HDAg (Glenn *et al.*, 1992), respectivamente. As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 100µl, contendo aproximadamente 10ng de DNA molde, solução tampão de PCR [75mM Tris-HCl pH 8.8, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20], 2mM MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP, 0.5nM de cada *primer* e 2.5U de polimerase de DNA *Taq* (Fermentas). Foi utilizado um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) e o seguinte programa de amplificação: (1) desnaturação inicial durante 3 minutos a 94°C; (2) 25 ciclos de amplificação compostos por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C e 2 minutos a 72°C e (3) 10 minutos a 72°C. Os *primers* sintéticos utilizados (tabela II.3.1.1) incluem os locais de restrição *MunI* e *SalI* (para amplificação do cDNA de S-HDAg) ou *MunI* e *BamHI* (para a amplificação do cDNA de L-HDAg), de modo a permitir a sua inserção no MCS do vector pAS2-1. Após amplificação, os fragmentos foram analisados por electroforese em gel de agarose e procedeu-se à sua purificação com o kit Illustra GFX (GE Healthcare). Os produtos de PCR foram em seguida digeridos, com as enzimas *MunI* e *SalI* ou *MunI* e *BamHI*.

Na preparação de fragmentos de DNA, para obtenção dos plasmídeos pAS2-1/ext_L-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg, utilizaram-se oligonucleótidos de cadeia simples e complementares, que permitiram obter os fragmentos de DNA em cadeia dupla pretendidos. No desenho dos oligonucleótidos (tabela II.3.1.1) foram incluídas as extremidades coesivas resultantes da

digestão com enzimas *MunI* e *Bam*HI ou *MunI* e *Sall*, para o plasmídeo pAS2-1/ext_L-HDAg ou pAS2-1/3NLS-HDAg, respectivamente, de modo a permitir a inserção directa dos fragmentos, nos locais *Eco*RI/*Sall* ou *Eco*RI/*Bam*HI do vector pAS2-1. Para a ligação dos oligonucleótidos, as cadeias simples complementares foram misturadas na razão molar 1:1 em tampão de emparelhamento [10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA]. A mistura foi submetida sequencialmente a diferentes temperaturas: 2 minutos a 72°C, 2 minutos a 37°C e 2 minutos a 25°C, para permitir o emparelhamento correcto das cadeias complementares.

Tabela II.3.1.1: Sequência dos *primers* ou oligonucleótidos sintéticos utilizados na preparação de fragmentos de DNA, a clonar no vector pAS2-1, para obtenção dos plasmídeos indicados.

CAATTG - local de reconhecimento da enzima *MunI*; GTCGAC - local de reconhecimento da enzima *Sall*; GGATCC - local de reconhecimento da enzima *Bam*HI.

Plasmídeo		Sequência nucleotídica (5'→3')	Dimensão (bps)
pAS2-1/ S-HDAg	Forward	TTATCAATTGATGAGCCGGTCCGAGTCG	608
	Reverse	TTATGTCGACCTATGGAAATCCCTGGTTTCCC	
pAS2-1/ L-HDAg	Forward	TTATCAATTGATGAGCCGGTCCGAGTCG	634
	Reverse	TTATGGATCCATTCCTGTTGGGTCGACAACTCTG	
pAS2-1/ ext_L-Dag	Forward	AATTGTGGGATATACTCTTCCCAGCCGATCCGCCCTTT TCTCCCCAGAGTTGTCGACCCCACTGAG	71
	Reverse	GATCCTCACTGGGGTCGACAACTCTGGGGAGAAAAGGG CGGATCGGCTGGGAAGAGTATTCCAC	
pAS2-1/ 3NLS-HDAg	Forward	AATTGGAGGGGGCTCCCCCGCGAAGAGGGCCCGAGAG GGGGCTCCCCCGCGAAGAGGGCCCGAGAGGGGGCTCC CCCCGCGAAGAGGGCCCGAC	100
	Reverse	TCGACTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGAGCCCCCTCTCG GGCCCTCTTCGCGGGGGAGCCCCCTCTCGGGCCCTCT TCGCGGGGGAGGCCCTCC	

Todos os fragmentos de DNA preparados anteriormente, quer através de amplificação por PCR quer por emparelhamento de oligonucleótidos em cadeia simples, foram introduzidos no vector pAS2-1 (Clontech), no local *Eco*RI/*Sall* (pAS2-1/S-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg) ou *Eco*RI/*Bam*HI (pAS2-1/L-HDAg pAS2-1/ext_L-HDAg), tendo sido utilizada a ligase de DNA do fago T4 (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. As misturas de ligação foram incubadas 1 hora à temperatura ambiente, tendo sido em seguida usadas para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5α, de acordo com o método do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989).

A inserção dos fragmentos de cDNA no vector foi confirmada por digestão enzimática com a enzima *Hind*III (Fermentas), tendo sido os fragmentos de DNA resultantes desta reacção analisados por electroforese em gel de agarose.

II.3.1.4 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

Os plasmídeos pAS2-1/S-HDAg, pAS2-1/L-HDAg, pAS2-1/ext_L-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg foram introduzidos em leveduras da estirpe AH109 de *S. cerevisiae* (MATa), por transformação, utilizando o método de acetato de lítio (LiAc; Gietz e Woods, 2006). Assim, misturaram-se cerca de 200ng de cada um dos plasmídeos com 100μg de DNA transportador, de esperma de arenque (Clontech), tendo-se em seguida adicionado 100μL de solução de células de levedura AH109, previamente tornadas competentes, e 200μL de solução PEG/LiAc [40% glicol de polietileno 4000, 10mM Tris, 1mM EDTA, 0.1M LiAc]. A mistura de transformação foi então incubada, durante 30 minutos, a 30°C, com agitação (200 rpm). No final da incubação, adicionaram-se 70μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a mistura foi submetida a choque térmico. Este consistiu na incubação a 42°C, durante 15 minutos, seguida de arrefecimento em gelo. As células foram sedimentadas por centrifugação a 13000 rpm, durante 5 segundos, e o sedimento foi ressuspenso em 100μL de TE. A totalidade das suspensões celulares (100μL) foi plaqueada em meio de selecção apropriado, constituído por meio mínimo sintético (SD, *synthetic dropout*), suplementado com todos os aa essenciais, excepto triptofano (SD/-Trp), e incubada a 30°C até ao aparecimento de colónias.

II.3.1.5 TESTE DE AUTO-ACTIVAÇÃO

A capacidade de auto-activação por parte das proteínas utilizadas como isco numa pesquisa YTH tem de ser testada. De modo a avaliar se as proteínas em estudo são autonomamente capazes de activar a transcrição dos genes repórteres, colónias isoladas de levedura da estirpe AH109 pré-transformadas com os plasmídeos isco, foram plaqueadas em meios de cultura deficientes nos aa cuja síntese é activada pelos genes repórteres (meio SD sem os aa histidina e adenina, SD/-His, SD/-Ade ou SD/-His/-Ade), e incubadas a 30°C durante 5 dias. Estas colónias foram também testadas para a expressão de α-galactosidase (produto do gene *MEL1*) pela adição do substrato 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosídeo (X-α-Gal) ao meio de cultura (SD/X-α-Gal).

II.3.1.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ISCO EM LEVEDURA

Para confirmar que as células de levedura AH109 transformadas com os plasmídeos isco expressam as proteínas pretendidas, prepararam-se extractos proteicos, que foram, em seguida, analisados por *Western blot*.

II.3.1.6.1 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS

A preparação de extractos proteicos de células de levedura foi efectuada de acordo com o método ureia/SDS descrito por Printen e Sprague (Printen e Sprague, 1994). Brevemente, colónias isoladas de levedura, transformadas com cada um dos plasmídeos em estudo, foram inoculadas em meio SD/-Trp e incubadas a 30°C com agitação (230 rpm), durante a noite. No final desta incubação, as culturas foram diluídas na razão de 1:10 e colocadas novamente a 30°C com agitação (230 rpm), até atingirem um valor de densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}), situado entre 0.4 e 0.6. Nesta fase as culturas foram rapidamente transferidas para tubos de centrifuga de 50ml, semi-preenchidos com gelo, que foram submetidos a centrifugação a 1,000g, durante 5 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram rejeitados e procedeu-se à lavagem dos sedimentos com água, previamente arrefecida em gelo. Seguiu-se nova centrifugação, nas mesmas condições, tendo-se novamente rejeitado os sobrenadantes. Os sedimentos foram ressuspensos em 100µL de tampão de lise [9M ureia, 5% SDS, 40mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1M EDTA, 0.04% azul de bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol], pré-aquecido a 60°C, e transferidos para tubos de microcentrífuga com cerca de 300µL de esferas de vidro (Sigma-Aldrich). Após 10 minutos de aquecimento a 70°C, para libertação das proteínas associadas a membranas, as amostras foram submetidas a agitação vigorosa, no *vortex*, durante 1 minuto, e centrifugadas a 14000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, os sobrenadantes foram aquecidos a 100°C durante 5 minutos, para promover a desnaturação proteica, e aplicados em géis de 12% poliacrilamida.

II.3.1.6.2 ELECTROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA, EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

A separação de proteínas, presentes nos extractos proteicos, foi realizada em géis verticais de 12% poliacrilamida, na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS), para garantir as condições desnaturantes. Utilizou-se um sistema descontínuo de dois géis (Laemmli, 1970), gel de resolução e gel de concentração, cujas composições se encontram descritas na tabela II.3.1.2.

A electroforese decorreu na presença de tampão de electroforese [25mM Tris, 192mM glicina e 0.1% SDS], a 60 V, enquanto as amostras se localizavam no gel de concentração, ou de 100 V desde que atingiram o gel de resolução. A electroforese foi realizada até o indicador azul de bromofenol atingir o final do gel.

Tabela II.3.1.2: Composição dos géis de resolução e concentração de poliacrilamida para *SDS-PAGE*.

Soluções	Volume a usar	
	Gel de resolução (12% poliacrilamida)	Gel de concentração (4% poliacrilamida)
30% (p/v) acrilamida (29:1 acrilamida/bisacrilamida)	4.0ml	1.2ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5ml	-
0.5M Tris-HCl pH6.8	-	2.0ml
Água destilada	3.4ml	4.6ml
10% SDS	100µl	100µl
10% persulfato de amónio (APS)	40µl	30.5µl
N,N,N',N',tetrametiletilenodiamina (TEMED)	20µl	30.5µl

II.3.1.6.3 WESTERN BLOT

No final da electroforese, os géis de poliacrilamida foram equilibrados em tampão de transferência [48mM Tris, 39mM glicina, 0.04% SDS, 10% metanol] e procedeu-se à transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose Protan BA 85 (Schleicher e Schuell), num aparelho de transferência semi-seca (Biorad Laboratories) a 100 mA, durante 50 minutos. Após transferência, as membranas foram bloqueadas, cerca de 1 hora, com 5% (p/v) de leite magro em PBS [80g/L NaCl, 2g/L KCl, 2g/L KH_2PO_4 , 14.34g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], seguindo-se incubação com o anticorpo primário (0.5µg/ml) também diluído em PBS com 5% de leite magro (p/v), a 4°C, com agitação suave, durante a noite. O anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal produzido em murganho, que reconhece especificamente o DNA-BD de GAL4 (Clontech). Após incubação, as membranas foram lavadas três vezes, durante 15 minutos, com PBS contendo 2% de leite magro (p/v) e 0.05% Tween 20. No final das lavagens, procedeu-se à incubação, com o anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de murganho conjugado com a enzima peroxidase (anti-IgG-HRP de murganho; BioRad Laboratories) diluído 1:3000 numa solução de PBS contendo 5% leite magro (p/v), à temperatura ambiente. Após 1 hora de incubação, realizaram-se três lavagens com PBS contendo 5% leite magro e 0,05% Tween 20, durante 10 minutos, seguidas de duas lavagens, durante 15 minutos, com PBS. A detecção das proteínas foi efectuada com o sistema quimioluminescente ECLTM *Western blotting analysis system* (GE Healthcare).

II.3.1.7 CONJUGAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA DE TIPOS OPOSTOS

A identificação de interacções entre proteínas de interesse e uma biblioteca de proteínas, expressas como fusões com o AD do factor de transcrição GAL4, foi realizada por meio de conjugação entre células de levedura de tipos de conjugação opostos (MATa ou MATα). Neste trabalho, utilizou-se uma biblioteca de cDNA de hepatócito humano, previamente clonada num vector de expressão com o AD de GAL4 (pGADT7-Rec; Clontech) e pré-transformada na estirpe Y187 de *S. cerevisiae* (*BD Matchmaker Pretransformed Libraries*; Clontech). A estirpe de Y187 (MATα), contendo a biblioteca de cDNA de hepatócito, foi conjugada com células de levedura da estirpe AH109 (MATa), previamente transformada com cada um dos plasmídeos isco, individualmente (pAS2-1/S-HDAg ou pAS2-1/3NLS-HDAg). O protocolo de conjugação foi iniciado pela inoculação de colónias isoladas de levedura da estirpe AH109, transformadas com cada um dos plasmídeos isco, em meio SD/-Trp e incubadas a 30°C com agitação (230 rpm), durante a noite. Uma vez atingida OD_{600nm} > 0.8, as culturas foram centrifugadas, a 1,000g durante 5 minutos e os sedimentos ressuspensos no sobrenadante residual (cerca de 5ml), com o auxílio de um vortex. Nesta fase, as culturas de células AH109 foram mantidas em gelo e procedeu-se à descongelação, num banho de água à temperatura ambiente, de alíquotas de 1ml de cultura de células Y187 pré-transformadas com a biblioteca de cDNA de hepatócito. Esta alíquota foi cuidadosamente agitada e adicionada a 45ml de meio 2x YPDA [40g/L peptona, 20g/L extracto de levedura, 40g/L agar, 0.003% adenina], juntamente com cada uma das culturas de AH109 previamente preparadas. As culturas resultantes foram incubadas a 30°C entre 20 a 24 horas, com agitação a 40 rpm. Após incubação, foram retiradas alíquotas das culturas, de modo a confirmar, por microscopia de contraste de fase, a presença de zigotos. As culturas voltaram a ser incubada nas mesmas condições por 4 horas adicionais sendo em seguida transferidas para tubos de polipropileno de 50ml e centrifugadas a 1,000g durante 10 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 10ml de 0.5x YPDA e as misturas foram plaqueadas em meios de crescimento apropriados. Deste modo, metade das misturas de conjugação foi plaqueada em meio selectivo quádruplo (QDO: SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His) e a outra metade em meio selectivo triplo (TDO: SD/-Leu/-Trp/-His). As colónias obtidas em meio TDO foram, em seguida, plaqueadas em meio QDO. Finalmente, todas as colónias sobreviventes foram plaqueadas em meio QDO com X-α-Gal (Clontech), tornando-se azuis as colónias dos verdadeiros positivos.

Para o cálculo da eficiência de conjugação, 100µl de diluições 1:10000, 1:1000, 1:100 e 1:10 das misturas de conjugação foram plaqueadas em meio sem triptofano ou/e sem leucina (SD/-Trp, SD/-Leu ou SD/-Trp/-Leu). Para o cálculo do título da biblioteca, alíquotas de 10µl das bibliotecas utilizadas foram adicionadas a 1ml de meio YPDA, correspondendo a um factor de diluição de 10^{-2} . Por sua vez, 10µl desta diluição foram novamente adicionados a 1ml de YPDA (factor de diluição 10^{-4}). Utilizaram-se 100µl desta segunda diluição para testar o crescimento em placas com meio SD/-Leu. As placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias, após os quais, se contabilizou o número de colónias obtidas. O título da biblioteca foi então determinado de acordo com a fórmula

$$\frac{\text{\#colónias}}{\text{volume plaqueado (ml)} \cdot \text{factor de diluição}} = \text{cfu/ml}$$

II.3.2 ANÁLISE DOS CLONES POSITIVOS

II.3.2.1 EXTRACÇÃO DE PLASMÍDEOS DE CÉLULAS DE LEVEDURA

Para se proceder à extracção de DNA plasmídico das colónias positivas, prepararam-se culturas líquidas em meio QDO. Após centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 100µl de tampão STET (50mM Tris pH 8.8, 50mM EDTA, 8% glucose, 5% Triton X-100). Adicionaram-se cerca de 300µl de esferas de vidro (245-600µm; Sigma-Aldrich) e seguiu-se agitação vigorosa em *vortex*, durante 8 minutos. Após a adição de 100µl de tampão STET, colocaram-se as amostras a 100°C durante 3 minutos e seguiu-se arrefecimento em gelo. As amostras foram centrifugadas e transferiram-se 150µl de sobrenadante para um novo tubo, ao qual se adicionaram 500µl de 7.5M acetato de amónio. Após incubação durante cerca de 2 horas a -20°C, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 10µl de uma solução estéril de RNase na concentração de 20µg/ml.

O DNA extraído de levedura foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, previamente tornadas competentes pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989). Os plasmídeos obtidos foram digeridos com a enzima *HindIII* e analisados por electroforese em gel de agarose, para identificação dos plasmídeos da biblioteca.

II.3.2.2 SEQUENCIAÇÕES DE DNA

O vector pGADT7-Rec possui uma sequência complementar ao *primer* T7 localizada a montante do local de inserção dos fragmentos de cDNA da biblioteca. Este *primer* foi utilizado nas reacções de sequenciação (STAB vida), permitindo obter as sequências de cDNA

imediatamente adjacentes à sequência codificante para o DNA-BD. Por fim, a comparação das sequências obtidas com uma base de dados de sequências de DNA (Genbank), permitiu a identificação das proteínas codificadas pelos plasmídeos analisados.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE AUTO-ACTIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS ISCO

Com o objectivo de identificar proteínas capazes de interagir com os HDAGs, ou especificamente com o NLS presente nos HDAGs, construíram-se três plasmídeos, pAS2-1/S-HDAg, pAS2-1/L-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg. Estes plasmídeos devem permitir a expressão de proteínas de fusão adequadas para utilização no sistema YTH, ou seja, codificam para proteínas de fusão constituídas pelo DNA-BD de GAL 4 e (1) S-HDAg (DNA-BD/S-HDAg), (2) L-HDAg (DNA-BD/L-HDAg) e (3) três cópias em *tandem* do NLS presente nos HDAGs (DNA-BD/3NLS-HDAg). Pelo facto da sequência responsável pela importação nuclear do HDAG ser formada por apenas 10 aa, optou-se por produzir uma proteína de fusão com o DNA-BD composta por três repetições do NLS de HDAG, dispostos em *tandem*.

A expressão das proteínas de interesse, em células de levedura, foi avaliada por *Western blot* com o anticorpo anti-GAL4 DNA-BD (Clontech), tendo sido analisados extractos proteicos de células de levedura AH109, pré-transformadas individualmente com cada um dos plasmídeos isco. Foi possível detectar a presença das três proteínas de fusão (DNA-BD/S-HDAg, DNA-BD/L-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg) com as massas moleculares esperados (40, 43 e 21 KDa, respectivamente; figura II.4.1.1), confirmando a expressão das proteínas de interesse a partir do promotor *ADH1*, presente no vector pAS2-1.

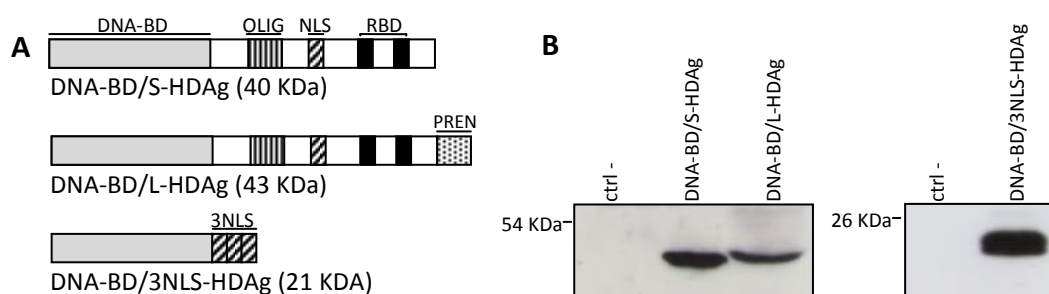


Figura II.4.1.1: Expressão das proteínas de fusão DNA-BD/S-HDAg, DNA-BD/L-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg, em células de levedura AH109. (A) Representação esquemática das proteínas de fusão indicadas com informação das respectivas massas moleculares. OLIG, NLS e RBD, representam os domínios de oligomerização, localização nuclear e de ligação ao RNA, respectivamente, presentes nos HDAGs. PREN representa a extensão de 19 aa adicionais com local de isoprenilação presente na L-HDAg (B) Extractos proteicos de células de levedura, pré-transformadas com plasmídeos codificantes para as proteínas isco, foram separados em géis de 12% poliacrilamida por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e detectados por *Western blot* pelo anticorpo anti-GAL4 DNA-BD (Clontech). Como controlo negativo (ctrl-) utilizaram-se extractos proteicos de células de levedura AH109 não transformadas.

Os três plasmídeos foram também testados quanto à sua capacidade de activar autonomamente genes repórteres. Assim, células de levedura AH109 transformadas individualmente com os três plasmídeos pAS2-1/S-HDAg, pAS2-1/L-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg, foram mantidas em placas com meios de crescimento selectivos (SD/-Trp/-Leu e SD/-Trp/-Leu/-Ade), de modo a avaliar a activação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*. A activação do gene repórter *MEL1* foi também analisada, pela presença de X-α-Gal no meio de crescimento (SD/-Trp/-Leu/-Ade/X-α-Gal). Nas placas com células de levedura a expressar as proteínas DNA-BD/S-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg não se verificou crescimento celular nos meios selectivos (figura II.4.2.1; meios SD/-Trp/-Hist e SD/-Trp/-Hist/-Ade), demonstrando a sua incapacidade de activar a transcrição de genes repórteres. Por outro lado, no caso das células a expressar a proteína DNA-BD/L-HDAg, houve crescimento em todos os meios selectivos, sendo ainda visível o aparecimento de cor azul no meio contendo X-α-Gal (figura II.4.1.2; meios SD/-Trp/-Hist/-Ade/X-α-Gal). Esta observação indica que a proteína DNA-BD/L-HDAg apresenta capacidade de auto-activação dos três genes repórteres *HIS3*, *ADE2* e *MEL1*, e impossibilita a sua utilização no sistema YTH escolhido.

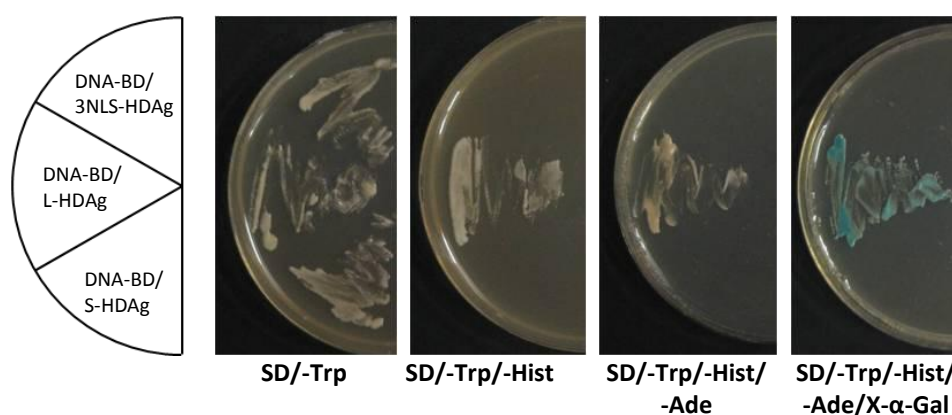


Figura II.4.1.2: Teste de auto-activação de genes repórteres pelas proteínas DNA-BD/S-HDAg, DNA-BD/L-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg. Células de levedura AH109 foram transformadas com plasmídeos que permitem a expressão das proteínas indicadas e seleccionadas para a presença destes plasmídeos pela capacidade de crescimento em meio sem triptofano (SD/-Trp). A activação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* foi avaliada pela capacidade de crescimento em meios sem histidina e adenina (-Hist e -Ade) e a activação do gene *MEL1* pela capacidade de metabolizar o substrato X-α-Gal com consequente desenvolvimento da cor azul.

Face ao resultado obtido no ensaio de auto-activação para proteína DNA-BD/L-HDAg, e uma vez que a L-HDAg é semelhante à S-HDAg com excepção de 19 aa adicionais na extremidade C-terminal, optou-se por construir um quarto plasmídeo isco pAS2-1/ext-L-HDAg, codificante para a sequência de 19 aa como fusão com o DNA-BD de GAL4. Após construção do

plasmídeo, procedeu-se à sua transformação em células de levedura da estirpe AH109 e realizou-se novamente o teste de auto-activação. Mais uma vez, observou-se a activação da transcrição dos três genes repórteres (figura II.4.1.3), o que impossibilita também a utilização desta proteína no sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid*.

Dada a inadequação da proteína L-HDAg no sistema YTH escolhido, esta proteína não foi utilizada nos ensaios para pesquisa de interacções, tendo-se prosseguido ao estudo apenas das proteínas S-HDAg e 3NLS-HDAg.

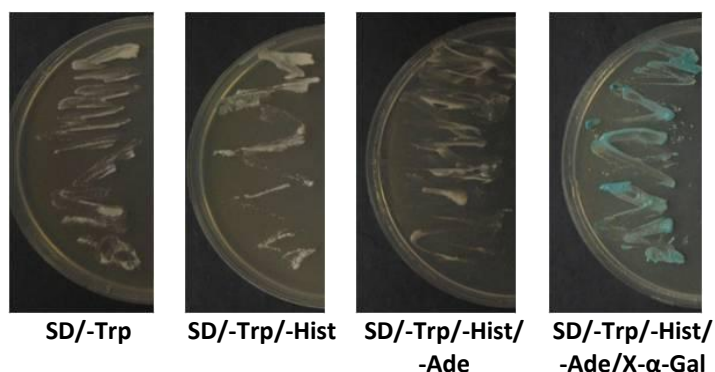


Figura II.4.1.3: Teste de auto-activação de genes repórteres pelas proteínas DNA-BD/ext_L-HDAg. Células de levedura AH109 foram transformadas com o plasmídeo que permite a expressão das proteínas DNA-BD/ext_L-HDAg e seleccionadas para a presença deste plasmídeo pela capacidade de crescimento em meio sem triptofano (SD/-Trp). A activação dos genes repórteres *HIS3* a *ADE2* foi avaliada pela capacidade de crescimento em meios sem histidina e adenina (-Hist e -Ade) e a activação do gene *MEL1* pela capacidade de metabolizar o substrato X-α-Gal com consequente desenvolvimento da cor azul.

II.4.2 PESQUISA DE INTERACÇÕES

O sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid* foi utilizado para pesquisa de interacções entre a S-HDAg, ou o NLS de HDAg, e proteínas expressas por uma biblioteca de cDNA de fígado humano (Clontech).

Inicialmente, os dois plasmídeos pAS2-1/S-HDAg e pAS2-1/3NLS-HDAg foram introduzidos individualmente em células de levedura da estirpe AH109, por transformação. Prepararam-se culturas líquidas destas células de levedura e procedeu-se à sua conjugação com células de leveduras de tipo sexual oposto (estirpe Y187), previamente transformadas com a biblioteca de cDNA de fígado humano. A mistura de conjugação foi plaqueada em meios apropriados para selecção da activação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* (TDO: SD/-Trp/-Leu/-Hist ou QDO: SD/-Trp/-Leu/-Hist/-Ade) e mantida a 30°C durante vários dias, até ao aparecimento de colónias. Foram ainda preparadas placas controlo para determinação do

número de clones pesquisados na biblioteca, assim como da eficiência da conjugação tendo-se obtido os valores indicados na figura II.4.2.2.

Cerca de 6 dias após o início da incubação, foi visível o início de crescimento de colónias em placas com meio TDO, tendo estas sido repicadas para novas placas com meio QDO.

As placas iniciais voltaram a ser incubadas, para permitir o crescimento de transformantes com interacções mais fracas. Após um período de 30 dias, um total de 203 clones foram obtidos para a S-HDAg e 211 para a 3NLS-HDAg. Inicialmente utilizou-se meio para seleccionar a activação de apenas um gene repórter, *HIS3* (meio TDO), porque nesta fase de crescimento, o nível de expressão proteica não é muito elevado, o que vai tornar reduzido o número de proteínas disponíveis para interagir e consequentemente activar os genes repórteres. De modo a facilitar a identificação de interacções mais fracas ou transientes, os clones devem ser primeiro submetidos a situações de restringências menos elevadas (meio TDO) e só em seguida testados para a activação dos outros genes repórteres. Assim, após selecção de crescimento em meio TDO, os clones foram testados para activação do gene *ADE2*, por transferência para meio QDO. Por último, os transformantes obtidos até aqui foram transferidos para meio contendo X- α -Gal, de modo a avaliar a activação do gene repórter *MEL1*. O produto do gene *MEL1* é a enzima α -galactosidase, que intervém na metabolização do substrato X- α -Gal, originando um produto de cor azul. Após o teste obtiveram-se 112 clones positivos para o ensaio da S-HDAg e 161 para o ensaio da 3NLS-HDAg (figura II.4.2.1).

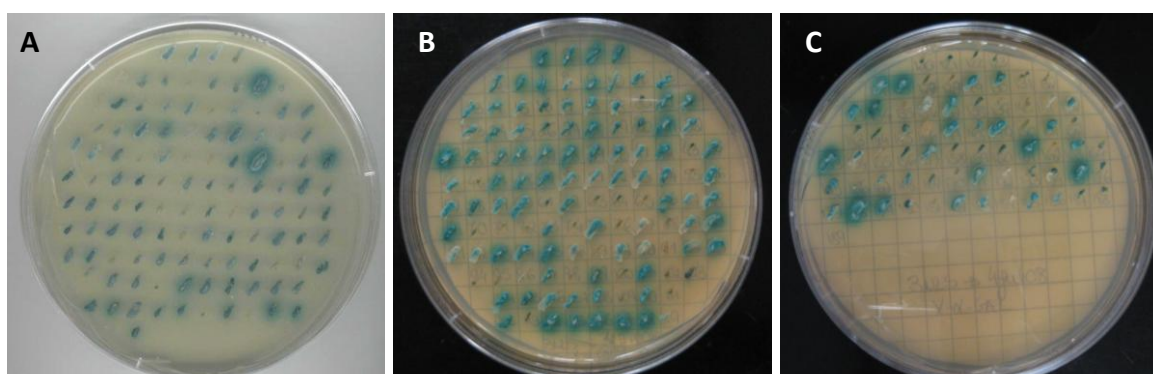


Figura II.4.2.1: Clones positivos identificados nos ensaios YTH com a proteína S-HDAg (A) e 3NLS-HDAg (B e C). As interacções positivas foram identificadas pelo crescimento em meio selectivo QDO, contendo X- α -Gal. As colónias de cor brancas representam os falsos positivos que crescem em meio QDO mas não desenvolvem cor azul na presença de X- α -Gal.

A figura II.4.2.2 apresenta um fluxograma resumindo o trabalho realizado, assim como os resultados obtidos.

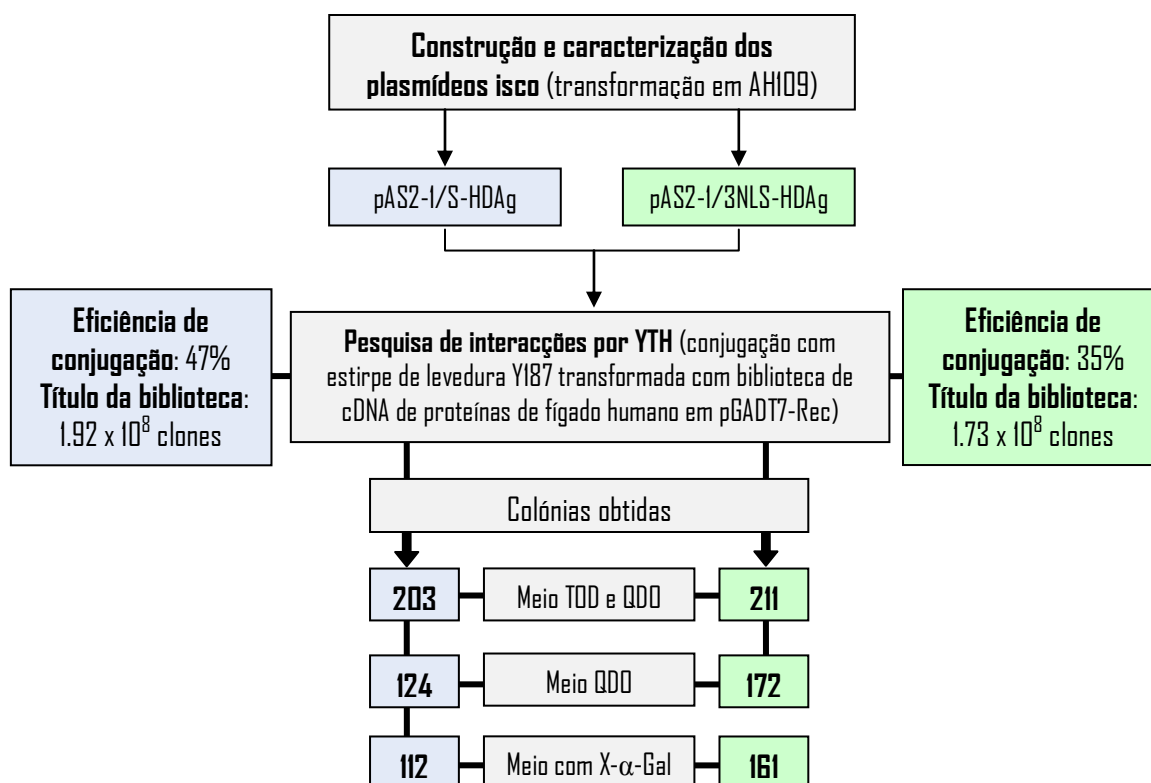


Figura II.4.2.2: Fluxograma resumindo o procedimento e resultados obtidos nos ensaios YTH realizados.

II.4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERACTORES

Para identificar e caracterizar as proteínas da biblioteca envolvidas em interações com as proteínas isco, procedeu-se ao isolamento dos plasmídeos da biblioteca dos clones positivos. Assim, prepararam-se culturas líquidas dos clones positivos obtidos e procedeu-se à extração do DNA plasmídico, que consiste numa mistura de vários plasmídeos, nomeadamente o plasmídeo isco e um ou mais plasmídeos da biblioteca. Deste modo, com o propósito de obter plasmídeos isolados para análise da sua sequência, esta mistura de DNA plasmídico foi, em seguida, transformada em células de *E. coli* DH5α. As colónias obtidas das transformações bacterianas foram recolhidas e os plasmídeos correspondentes, foram isolados sujeitos a análise de restrição por digestão enzimática com a enzima *Hind*III. A análise de restrição permitiu identificar os plasmídeos da biblioteca, uma vez que estes apresentam um padrão de restrição distinto do plasmídeo pAS2-1/S-HDAg ou pAS2-1/3NLS-HDAg (figura II.4.3.1).

Em alguns casos não foi possível isolar plasmídeos da biblioteca com inserções de cDNA de dimensão significativa. De facto, nestas situações, a análise por restrição revelava que apenas se isolavam o plasmídeo isco (pAS2-1/S-HDAg ou pAS2-1/3NLS-HDAg) e/ou o vector

pGADT7-Rec vazio (ou com uma inserção de cDNA de dimensão muito reduzida, com cerca de 50 a 100 bps). Para estes casos, todo o procedimento, com início na etapa extracção de DNA plasmídico de clones positivos, foi repetido, contudo, na maioria das vezes o resultado obtido era idêntico. Tal como referido anteriormente, é possível que um clone positivo possua mais plasmídeos do que os responsáveis pela expressão das duas proteínas interactuantes. Por exemplo, podem existir vários plasmídeos da biblioteca no mesmo clone, ainda que apenas um deles codifique para a proteína envolvida na interacção com a proteína isco. Assim, a presença de múltiplos plasmídeos da biblioteca no mesmo clone, dificulta a obtenção daquele que contém a sequência de cDNA com informação relativa à proteína que verdadeiramente contribui para a interacção. Por esta razão, apesar dos 112 clones iniciais no ensaio com a S-HDAg, no total apenas se obtiveram 57 plasmídeos da biblioteca que foram, em seguida, submetidos a análise por sequenciação.

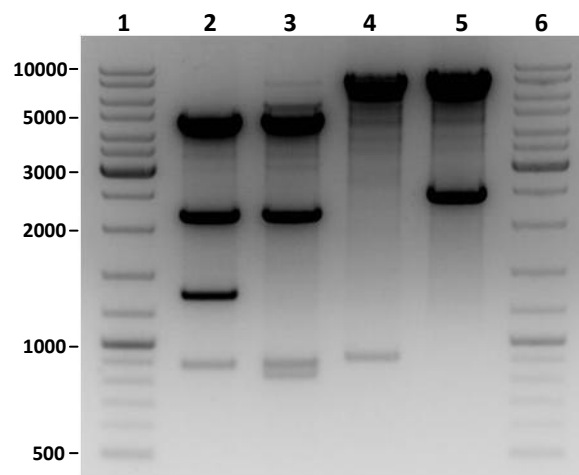


Figura II.4.3.1: Análise dos padrões de restrição enzimática pela enzima *HindIII* apresentados pelos plasmídeos isolados dos clones positivos. (1 e 6) marcador de DNA (O'Gene Ruler, Fermentas); (2) pAS2-1/S-HDAg (4565+2193+1325+887 bps); (3) pAS2-1/3NLS-HDAg (4565+219+887+723); (4) vector pGADT7-Rec vazio (7188+871); (5) pGADT7-Rec com inserção de cDNA da biblioteca (7188+2400). Indicação dos pesos moleculares em bp.

No caso da pesquisa YTH com a sequência responsável pela importação do HDAg (3NLS-HDAg), a abordagem seguida foi ligeiramente diferente, sendo que não se procedeu inicialmente à extracção e selecção dos plasmídeos da biblioteca presentes em todos os clones positivos. Uma vez que se pretendiam detectar especificamente proteínas envolvidas no mecanismo de importação nuclear, tentou-se minimizar o esforço envolvido no processo de extracção, selecção e sequenciação dos plasmídeos da biblioteca presentes nos 161

clones positivos. Assim, começou-se por extrair apenas plasmídeos de 20 clones positivos que foram também analisados por sequenciação dos respectivos cDNAs.

II.4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE CDNA

Os plasmídeos da biblioteca isolados dos clones positivos foram submetidos a análise por sequenciação. Nas reacções de sequenciação utilizou-se o *primer* T7 que permitiu a obtenção das sequências presentes nas inserções de cDNA. Posteriormente, a análise pelo *software* BLAST, das sequências obtidas permitiu identificar as proteínas codificadas pelas sequências de cDNA.

Na pesquisa YTH com a proteína S-HDAg, foram sequenciados 57 plasmídeos, no entanto, obtiveram-se algumas sequências de má qualidade, com muitos nucleótidos indeterminados, não tendo sido possível utilizá-las em alinhamento por BLAST. Por outro lado, mesmo para as sequências bem determinadas, nem sempre se verificou semelhança com proteínas conhecidas. Por exemplo, nalguns casos, as sequências obtidas não revelaram homologias com sequências codificantes (CDS) de proteínas conhecidas, mas antes com sequências não traduzidas, localizadas em regiões 3' não traduzidas do mRNA (3'-UTR). De facto, a expressão de sequências peptídicas codificadas por estas regiões não traduzidas do mRNA, é possível, dado o modo como a biblioteca de cDNA é preparada e clonada no vector pGADT7-Rec. Ainda que, efectivamente, se verifiquem interacções entre as sequências peptídicas produzidas e a proteína isco, não devem ser consideradas uma vez que não correspondem a proteínas naturalmente produzidas no organismo. Por último, um dos alinhamentos revelou homologia com uma sequência de RNA ribossomal 28S. Excluindo estes casos, em 45 dos plasmídeos sequenciados foi possível identificar ORFs. Estes resultados encontram-se resumidos na figura II.4.4.1.

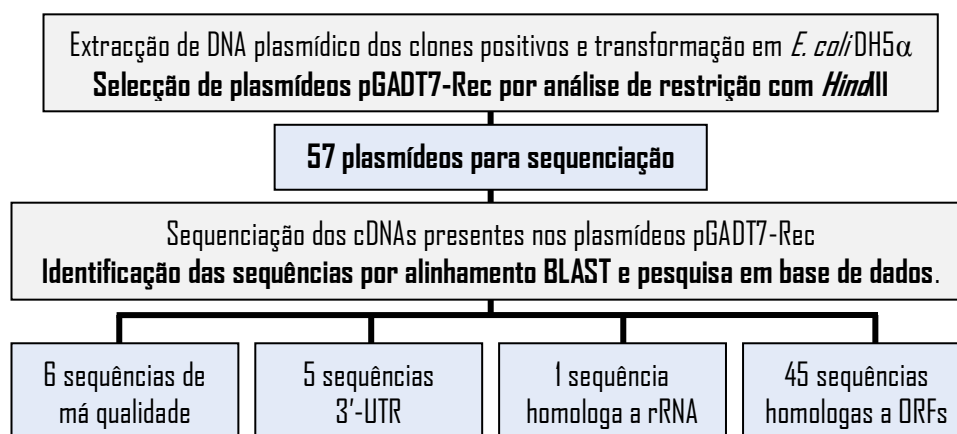


Figura II.4.4.1: Fluxograma resumindo o procedimento e resultados obtidos na análise dos plasmídeos de clones positivos obtidos no ensaio YTH com a S-HDAg.

A análise das 45 grelhas ORFs detectadas, levou à identificação de 30 proteínas conhecidas (tabela II.4.4.1), uma vez que em alguns dos plasmídeos foi identificada a mesma proteína.

Tabela II.4.4.1: Descrição das proteínas identificadas no ensaio YTH realizado com a S-HDAg.

Proteína (símbolo do gene) [nº Genbank]	nº de clones	Dimensão do fragmento (kb)	Localização preferencial
Proteína associada a BRCA1 (BAP1) [NP_004647]	1	1.6	Núcleo
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea C, isoforma 1 (HNRNPC) [NP_004491.2]	5	1.1 – 2.5	
Proteína associada aos receptores TNF e TRAF (TTRAP) [EAW55458.1]	1	1.9	
Raly, proteína de ligação a RNA (RALY) [NP_057951.1]	1	2.2	
Proteína com domínios cromó-helicase e de ligação a DNA (CHD7) [NP_060250.2]	1	2.2	
Hu antígeno R (ELAVL1) [NP_001410.2]	1	1.1	
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A/B (HNRNPAB) [NP_112556.2]	1	0.9	
Proteína com domínio de repetição de anquirinas 11 (ANKRD11) [NP_037407.4]	1	1.0	
Regulador de cromatina dependente de actina, associado a matriz, relacionado a SWI/SNF, subfamília a, membro 2 (SMARCA2) [NP_003061.3]	1	1.0	
Proteína 2 de ligação a EBNA1 (EBP2) [NP_006815.2]	1	0.9	Nucléolo
Proteína com domínio ribossomal L1 (RSL1D1) [CAA07491.1]	1	0.9	
Proteína <i>zinc finger</i> 533 (ZNF533) isoforma 2 [NP_001106868.1]	1	2.1	?
17 β hidroxisteróide desidrogenase tipo 4 (HSD17B4) [NP_000405.1]	2	2.7	Peroxissoma
Antitrombina III (SERPINC1) [NP_000479.1]	1	1.0	Extracelular
Apolipoproteína E (APOE) [NP_000032.1]	5	0.3 – 1.1	
Glicoproteína ácida α 1 (ORM1) [NP_000598.2]	5	0.2 - 1.0	
17 β hidroxisteróide desidrogenase tipo 6 (HSD17B6) [NP_003716.2]	1	1.1	Retículo endoplasmático
Receptor de ribossoma/P180 [BAF73807.1]	1	0.3	
Complexo activador do proteassoma subunidade 2 (PSME2) [NP_002809.2]	1	0.7	Proteassoma

Proteína de reconhecimento de tumores de células <i>natural killer</i> (NKTR) [NP_005376]	1	1.9	Membrana plasmática
Componente do complemento C3 (C3) [NP_000055.2]	1	0.3	
Proteína ribossomal semelhante a L36A (RPL36AL) [NP_000992.1]	1	0.6	
Proteína ribossomal S15 (RPS15) [NP_001009.1]	1	0.2	Ribossoma
Proteína ribossomal L13 (RPL13) [NP_000968.2]	2	0.2	
Sintetase de ATP, subunidade 8 [ACQ75157.1]	2	0.3	
Oxidase de citocromo, subunidade III (MT-COIII) [ACT53100.1]	1	0.2	
Desidrogenase de NADH subunidade II (MT-ND2) [ACT53095.1]	1	0.3	Mitocôndria
Desidrogenase de NADH subunidade 4 (MT-ND4) [ACQ76111.1]	1	0.2	
Desidrogenase de NADH (ubiquinona) 1 β subcomplexo, 7 (NDUFB7) [NP_004137.2]	1	0.2	
Oxidase de citocromo, subunidade I (MT-COI) [ACI04331.1]	1	0.7	

Por sua vez, a análise dos 20 plasmídeos extraídos de clones positivos obtidos na pesquisa YTH com a proteína 3NLS/S-HDAg, permitiu identificar 7 proteínas que se encontram descritas na tabela II.4.4.2.

Tabela II.4.4.2: Descrição das proteínas identificadas no ensaio YTH realizado com a 3NLS-HDAg.

Proteína (símbolo do gene) [nº Genbank]	nº de clones	Dimensão do fragmento (kb)	Localização preferencial
Subunidade 5 do complexo signalossoma COP9 (COPS5) [NP_006828.2]	4	1.1-1.4	Núcleo
Serina hidroximetiltransferase, citosólica (SHMT1) isoforma 1 [NP_004160.3]	11	1.1-2.1	Citoplasma
Carioferina α 4 (KPNA4) [CAA07491.1]	1	1.2	
17 β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 4 (HSD17B4) [NP_000405.1]	1	2.5	Peroxisoma
Candidato 2 do desenvolvimento da mesoderme (MESDC2) [NP_055969.1]	1	0.7	Retículo endoplasmático
Proteína ribossomal L28, isoforma 2 (RPL28) [NP_000982.2]	1	0.3	Ribossoma
Oxidase de citocromo, subunidade I (MT-COI) [ACI04331.1]	1	0.7	Mitocôndria

II.5 DISCUSSÃO

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo identificar proteínas com capacidade de interacção com os HDAGs. Pelo facto de codificar apenas uma proteína viral, admite-se que o HDV estará muito dependente dos factores celulares do hospedeiro e, neste sentido, a identificação dos factores com os quais os HDAGs interactuam poderá contribuir para o esclarecimento de várias etapas do ciclo de replicação do vírus.

Até à data, foram descritas várias proteínas com capacidade de interactuar com os antigénios e RNAs do HDV, desempenhando funções importantes no ciclo viral (revisto em Greco-Stewart e Pelchat, 2010). Ainda assim, e apesar destes progressos, muitos aspectos da biologia e patogénese do HDV continuam pouco claros, o que sugere que muitas interacções entre os componentes do vírus e factores celulares do hospedeiro, permanecem por identificar.

Várias estratégias e metodologias têm vindo a ser desenvolvidas para facilitar a identificação de interacções proteicas. Entre estas, encontra-se o sistema YTH, uma ferramenta para o estudo de interacções *in vivo* que permite a utilização de proteínas na sua forma nativa, contribuindo assim para a detecção de interacções fisiologicamente relevantes. Por outro lado, uma das vantagens mais importantes do método é a facilidade de identificação das proteínas interactuantes, permitindo o acesso imediato ao gene que a codifica.

Desde a sua primeira versão, o sistema YTH tem vindo a ser constantemente melhorado. A incorporação de vários genes repórter para avaliar a activação da transcrição, o desenho de sequências de ligação ao DNA nas regiões promotoras de diferentes genes repórter e o uso de vectores de número de cópias reduzido que minimizou a sobre-expressão de proteínas permitiu um melhoramento significativo da qualidade dos dados originados por experiências YTH (Cusick *et al.*, 2005). Apesar de algum cepticismo, quando acompanhado de ensaios complementares para confirmação das interacções detectadas, tais como ensaios de co-imunoprecipitação utilizando anticorpos específicos, de *pull-down* ou de co-localização, o sistema constitui uma ferramenta valiosa e de elevada aplicação. De tal modo que o interactoma de vários organismos, tais com *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), *C.elegans* (Walhout *et al.*, 2000) ou *D. melanogaster* (Giot *et al.*, 2003) encontra-se actualmente bem descrito principalmente pelo contributo do sistema YTH.

Tendo em conta as vantagens do método YTH, neste trabalho pretendeu-se utilizá-lo, com o propósito de identificar factores celulares, capazes de interagir com ambas as formas do

HDAg (S-HDAg e L-HDAg) e também com um domínio específico dos HDAGs, o NLS. Existem muitos sistemas YTH disponíveis comercialmente, cada um com características diferentes, adequadas a diferentes tipos de proteínas. A escolha do sistema a utilizar deve ter por base as propriedades das proteínas que se pretendem estudar, nomeadamente a sua localização e função. O sistema escolhido neste trabalho foi o *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid* (Clontech), um sistema apropriado para o estudo de proteínas nucleares, como é o caso dos HDAGs.

O procedimento YTH foi iniciado com a construção de plasmídeos para a expressão das três proteínas isco, S-HDAg, L-HDAg e 3NLS-HDAg, como fusão com o DNA-BD de GAL4 (DNA-BD/ S-HDAg, DNA-BD/ L-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg). Os plasmídeos foram transformados em células de levedura e a expressão das proteínas pretendidas foi confirmada por *Western blot*. Uma vez validada a expressão das proteínas isco, procedeu-se ao teste de auto-activação. A auto-activação da expressão dos genes repórteres constitui um problema comum a várias proteínas, principalmente os factores de transcrição. É portanto crítico que as proteínas a utilizar como isco sejam testadas para a sua capacidade de auto-activação, previamente à pesquisa de interacções na biblioteca. Os resultados do teste revelaram que as proteínas isco DNA-BD/S-HDAg e DNA-BD/3NLS-HDAg não apresentam capacidade de activar os genes repórteres, sendo por isso apropriadas para o sistema YTH escolhido. Por sua vez, no caso da DNA-BD/L-HDAg, foi observada a activação dos três genes repórteres testados, o que impede a sua utilização na pesquisa por interacções pelo sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid*.

O resultado obtido no teste de auto-activação da L-HDAg sugere que esta proteína funciona como factor de transcrição em levedura, uma vez que, ao ser expressa como fusão com o domínio DNA-BD (DNA-BD/L-HDAg), permite a transcrição de genes repórteres sob o controlo do factor de transcrição GAL4. Este facto é, de certo modo, surpreendente tendo em conta que a L-HDAg é admitida como inibidor dominante da transcrição do HDV (Chao *et al.*, 1990).

Na tentativa de explicar o resultado anterior, e uma vez que a S-HDAg e L-HDAg diferem apenas na sequência de 19 aa adicionais na extremidade C-terminal da L-HDAg, optou-se por avaliar a capacidade de auto-activação pela parte de uma proteína de fusão composta pela sequência de 19 aa e pelo DNA-BD (DNA-BD/ext_L-HDAg). Verificou-se que a proteína DNA-BD/ext_L-HDAg apresenta igualmente capacidade de activar a transcrição dos genes repórteres, o que sugere que a sequência de 19 aa é responsável pelas propriedades

intrínsecas de factor de transcrição observadas para a L-HDAg em células de levedura. Assim, de certo modo, este resultado pode constituir um argumento a favor da hipótese, actualmente aceite, para explicar as diferentes funções biológicas associadas a cada um dos HDAGs em células animais. De facto, admite-se que a sequência de 19 aa terminais da L-HDAg determina as suas propriedades distintas da S-HDAg, nomeadamente por ser alvo de uma modificação pós-traducional de isoprenilação (Hwang e Lai, 1993). Pelo facto das reacções de prenilação observadas em células de levedura e animais serem muito semelhantes (Omer e Gibbs, 1994), a eventual inexistência de isoprenilação não explicaria o comportamento observado para a L-HDAg em levedura. Assim, uma hipótese para justificar a capacidade de auto-activação da L-HDAg poderá relacionar-se com uma possível associação entre a sequência de 19 aa e um factor celular de levedura, capaz de directa ou indirectamente, iniciar a transcrição de genes repórteres.

Face à impossibilidade de utilização do sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid*, para a pesquisa de interactores da L-HDAg, devem ser considerados outros sistemas YTH. O sistema transactivador reprimido (RTA), em princípio, será adequado. Neste sistema, proposto por Hirst e colaboradores para estudar interacções com factores de transcrição, as duas proteínas de interesse interactuam para silenciar a transcrição do gene repórter (Hirst *et al.*, 2001). Ou seja, a proteína de interesse, com propriedades de activação em *trans*, é expressa como uma fusão com o DNA-BD do factor de transcrição, logo possibilita a activação do gene repórter. Quando esta proteína interactua com outra proteína de interesse, expressa como uma fusão com o domínio de repressão (RD) de um factor repressor, a transcrição do gene repórter é interrompida. Assim, este sistema parece uma boa alternativa para estudar as interacções da proteína L-HDAg, no entanto, neste trabalho optou-se por não prosseguir o estudo nesse sentido, continuando com a pesquisa de interacções apenas para as proteínas S-HDAg e 3NLS-HDAg, pelo sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid*.

A pesquisa de interacções foi realizada por conjugação de células de leveduras AH109 (*MATa*) pré-transformadas com as proteínas isco, com células de levedura Y187 (*MATα*) previamente transformadas com a biblioteca de cDNA de hepatócito humano.

No caso da proteína S-HDAg, de acordo com os cálculos realizados, foram pesquisados $1,92 \times 10^8$ clones da biblioteca de cDNA, tendo sido seleccionados 112 clones positivos, com capacidade de activar os três genes repórteres *ADE2*, *HIS3*, *MEL1*. No entanto, após extracção dos plasmídeos dos 112 clones positivos, apenas 57 foram submetidos a análise por sequenciação. Nos restantes clones, os plasmídeos isolados continham inserções de

cDNA de dimensões muito reduzidas, antevendo que os péptidos codificados por estes plasmídeos são compostas por apenas alguns resíduos de aa (10 a 30 aa). Estes pequenos fragmentos peptídicos, são comuns a mais do que uma ORF impossibilitando a identificação inequívoca de uma única proteína, pelo que foram descartados das análises posteriores.

A ocorrência de um número elevado de plasmídeos da biblioteca com inserções de cDNA muito reduzidas (ou inexistentes) evidencia a fraca qualidade da biblioteca. Por outro lado, dos 57 plasmídeos que seguiram para análise por sequenciação, alguns continham sequências de regiões 3'-UTR, assim como uma sequência correspondente a rRNA, colocando novamente em causa a qualidade da biblioteca utilizada. De facto, se a escolha da proteína isco numa pesquisa YTH é crítica para o sucesso do ensaio, a biblioteca também deve ser bem analisada. Uma grande desvantagem das bibliotecas obtidas pela clonagem de fragmentos de cDNA consiste no modo descontrolado pelo qual as sequências de cDNA são adicionadas à sequência codificante do factor de transcrição no vector utilizado para a construção da biblioteca. Em muitos casos, as proteínas híbridas são expressas a partir de regiões 5' ou 3'-UTR de mRNAs. As proteínas não naturais resultantes constituem assim uma fonte de interações irrelevantes a adicionar ao número, já elevado, de falsos positivos (Koegl e Uetz, 2008).

No que respeita aos plasmídeos onde foram identificadas ORFs, num total de 45 plasmídeos, foi possível identificar 30 proteínas distintas, com alguns dos plasmídeos a codificarem a mesma proteína. A análise detalhada das propriedades das proteínas identificadas teve como objectivo avaliar possíveis envolvimentos na replicação do HDV. Esta análise é fundamental pois permitirá seleccionar proteínas prioritárias para a continuação do estudo da sua interacção com o HDAG.

Algumas proteínas foram inicialmente descartadas, nomeadamente as codificadas pelo genoma mitocondrial. O genoma da mitocôndria codifica para 13 proteínas, todas elas associadas à obtenção de energia pela respiração celular. Estas proteínas são produzidas autonomamente na mitocôndria, por intermédio de tRNAs e rRNAs, também codificados pelo genoma mitocondrial. Por esta razão, as mitocôndrias possuem um código genético específico, com diferenças relativamente aos padrões do código genético para o genoma nuclear, nomeadamente no que respeita aos codões *stop* (Anderson *et al.*, 1981). Na pesquisa YTH, pelo facto de se encontrarem inseridos no plasmídeo pGADT7-Rec, estes cDNAs mitocondriais são transcritos e traduzidos pela mesma maquinaria enzimática do genoma nuclear. Deste modo, as proteínas de fusão resultantes são muitas vezes compostas

pelo DNA-BD e uma sequência polipeptídica de dimensão muito reduzida, devido ao aparecimento prematuro de codões *stop*. Pelo facto de serem produzidas estas sequências polipeptídicas muito pequenas, as proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial têm vindo a ser admitidas como falsos positivos em sistemas YTH (Serebriiskii e Golemis, 2001). Para além destas proteínas, há também outras descritas como falsos positivos comuns, que podem então ser excluídas para continuação do estudo, pelo menos na fase inicial. De acordo com a lista apresentada por Golemis e colaboradores (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>), entre os falsos positivos frequentes, encontram-se, proteínas ribossomais, proteínas *zinc finger*, subunidades do proteassoma, proteínas mitocondriais codificadas pelo genoma nuclear, tais como oxidases de citocromos e ATP sintetases.

É ainda importante notar que algumas das interacções detectadas, ainda que possam representar interacções efectivas no contexto YTH, são pouco prováveis de ocorrer *in vivo* pelo facto das proteínas envolvidas se encontrarem fisicamente indisponíveis. Deste modo, as proteínas extracelulares não deverão representar interacções biologicamente relevantes com os HDAGs, dadas as localizações diferentes. Este é o caso das proteínas apolipoproteína E, glicoproteína ácida $\alpha 1$, do componente do complemento C3 ou da proteína de reconhecimento de tumores de células *natural killer* (NKTR). Note-se que não se pode excluir a possibilidade de ocorrerem interacções importantes entre as proteínas mencionadas anteriormente e o S-HDAG, no entanto, o que se pretende é iniciar o estudo com interacções, à partida, mais prováveis de ocorrer e de se encontrarem envolvidas na replicação do HDV.

Pelo facto da S-HDAG ser indispensável para a replicação do HDV (Kuo *et al.*, 1989), as proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos constituem um grupo de candidatos a um possível envolvimento na replicação viral. Entre estes candidatos destacam-se, por exemplo, as proteínas com capacidade de ligação a RNA (RBP), nomeadamente a proteína Hu antígeno R, uma proteína da família das ELAVL (semelhante a *embryonic lethal vision abnormal*) cujo envolvimento na replicação de outros vírus tem vindo a ser descrito por vários autores (Spångberg *et al.*, 2000 e Lemay *et al.*, 2008). As ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, hnRNPC e hnRNPA1/B2, envolvidas no processo de biogénese de mRNAs (Dreyfuss *et al.*, 1993), são também RBPs que podem realizar interacções relevantes com a S-HDAG. Foi ainda identificada outra RBP, a proteína Raly, que aparentemente também integra a família das hnRNPs (Nakielnny e Dreyfuss, 1996), ainda que se encontre

pouco descrita. Inicialmente identificada em murganho (Michaud *et al.*, 1993), a homóloga humana foi mais tarde clonada (Vaughan *et al.*, 1995), levando à verificação de que a Raly possui uma estrutura muito semelhante à da proteína hnRNPc, possuindo um RBD na região N-terminal com 70% de identidade com o RBD da proteína hnRNPc e um domínio auxiliar, com 30% de identidade como o domínio correspondente em hnRNPc. (Vaughan *et al.*, 1995).

Algumas das proteínas identificadas podem também estar relacionadas com a patogénese do vírus. O HDV tem vindo a ser associado a um aumento do risco de desenvolvimento de cirrose assim como de carcinoma hepatocelular (Fattovich *et al.*, 2000). Também Choi e colaboradores demonstraram a implicação do L-HDAg na modulação das cascatas de sinalização do TGF- β (factor de transformação de crescimento- β), tendo sido sugerida a sua relação com o desenvolvimento de fibrose hepática associada ao HDV (Choi *et al.*, 2007). No entanto, actualmente, os mecanismos responsáveis pela patogénese do HDV, nomeadamente a contribuição dos HDAGs, não são totalmente conhecidos. Neste sentido, algumas das proteínas identificadas neste trabalho podem contribuir para a sua elucidação.

A proteína Smarca2 encontra-se na célula como um componente integrante de complexos multiproteicos reguladores de cromatina, SWI/SNF, responsáveis pela activação ou repressão da transcrição de vários genes celulares (Muchardt e Yaniv, 2001). Estes complexos são constituído por proteínas com actividade de hidrolase de ATP e helicase, utilizando a energia da hidrólise de ATP para enfraquecer as interacções entre histonas e DNA, e permitindo a ligação de factores de transcrição em locais específicos do DNA (Know *et al.*, 1994). Assim, e tendo em consideração os resultados obtidos em duas abordagens proteómicas, que demonstraram alterações na expressão de proteínas celulares causadas pelo HDV (Mota *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2009), a interacção entre o S-HDAg e o complexo SWI/SNF, pode sugerir o envolvimento deste complexo nas alterações de expressão verificadas para este vírus.

Outra das proteínas identificadas, a proteína com domínios cromo-helicase e de ligação a DNA 7 (CHD7), também apresenta funções relacionadas com a regulação da expressão génica, por remodelação da cromatina (Woodage *et al.*, 1997; Cavalli e Paro, 1998). Assim, a confirmar-se a interacção com o S-HDAg e a CHD7, uma possível implicação na alteração da expressão proteica causada pela infecção com o HDV, deveria ser investigada.

A proteína associada aos receptores TNF e TRAF (TTRAP) foi descrita como uma proteína capaz de interagir com membros da família dos receptores de factores de necrose

tumoral (TNF-R) e também de inibir a activação dos factores nucleares- κ B (Pype, 2000). Num estudo independente foi identificada como interactuante e regulador negativo da activação transcricional do factor ETS1, da família dos factores nucleares ETS (E-vinte seis; Pei *et al.*, 2003). Pelo facto de interactuar com ambos os factores nucleares NF- κ B e ETS1, e inibir as suas actividades transcripcionais, uma das funções da TTRAP pode incluir a regulação da transcrição. Por outro lado, pelo facto da expressão da proteína TTRAP poder ser induzida pelo interferão- γ , também foi sugerido que possa estar envolvida na resposta celular a infecções virais (Xu *et al.*, 2008). De facto, a interacção entre a TTRAP e outras proteínas virais também tem sido reportada, nomeadamente pelas interacções detectadas com a proteína da nucleocapside do hantavírus (Lee *et al.*, 2003) e com a integrase do HIV (Zhang *et al.*, 2009).

A BAP1, proteína associada a BRCA1 (proteína 1 de início precoce do cancro mamário), intervém no controlo do crescimento do cancro mamário, por interacção com a proteína BRCA1, tendo sido sugerida a sua função como uma proteína supressora de tumores (Jensen *et al.*, 1999). Por outro lado, a identificação de um domínio de hidrolase C-terminal de ubiquitina (Jensen *et al.*, 1999) levou à investigação de um possível envolvimento da BAP1 em modificações pós-traducionais por desubiquitinação. Assim, após Misaghi e colaboradores (Misaghi *et al.*, 2009) demonstrarem a interacção entre BAP1 e o factor celular 1 do hospedeiro (HCF-1), outros autores (Machida *et al.*, 2009) provaram que o HCF-1 constitui um substrato para a actividade de hidrolase de ubiquitina da BAP1. Dado que a utilização do sistema da ubiquitina tem emergido como um tema central em torno da replicação viral, a identificação de uma enzima envolvida neste sistema, pode sugerir o seu envolvimento na replicação do HDV. De facto, actualmente conhecem-se vários vírus capazes de modular reacções de ubiquitinação/desubiquitinação de proteínas, de modo a criarem vantagens a nível da replicação viral, assim como vírus que codificam para as suas próprias ligases e hidrolases de ubiquitina (Isaacson e Ploegh, 2009). Também a apoiar esta hipótese, foi reportado recentemente que a S-HDAg é alvo de SUMOilação, uma modificação pós-traducional muito semelhante à ubiquitinação, e que esta alteração aumenta selectivamente a síntese de RNA genómico e mRNA do HDV (Tseng *et al.*, 2010).

A proteína com domínio de repetição de anquirinas 11 (ANR11) foi outra das proteínas identificadas neste trabalho. Inicialmente descrita como uma proteína com capacidade de interactuar com membros da família p160, suprimindo a sua função como co-activadores da transcrição (Zhang *et al.*, 2004), a ANR11 foi mais tarde reconhecida como uma proteína de

ligação ao p53, facilitando a ligação deste a DNA, assim como a activação da transcrição (Neilsen *et al.*, 2008). Face à sua capacidade de potenciar as funções do p53, a ANR11 foi sugerida como uma proteína supressora de tumores (Neilsen *et al.*, 2008).

A identificação de proteínas envolvidas na regulação da transcrição génica (ANR11, SMARCA2, CHD7), no desenvolvimento de tumores (BAP1, ANR11) e na transdução de sinais (TTRAP), poderá contribuir para clarificar a ocorrência e desenvolvimento de cirrose, fibrose hepática ou carcinoma hepatocelular causados pelo HDV. No entanto, a contribuição destas proteínas para patogénese do HDV deve ser convenientemente investigada.

Neste trabalho foram também identificadas duas proteínas que se localizam preferencialmente no nucléolo. A ocorrência destas proteínas entre os positivos pode ser interessante, uma vez que foram previamente descritas duas proteínas nucleolares com capacidade de interagir com o HDAG, a nucleolina e a fosfoproteína B23 (Lee *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Por outro lado, algumas linhas de investigação têm suportado a ideia de que a síntese de RNA antigenómico de HDV ocorre no nucléolo, provavelmente pela acção da RNA polimerase I (Li *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Neste sentido a confirmação da interacção entre proteínas nucleolares e a S-HDAG poderá contribuir para fundamentar a hipótese proposta por aqueles autores, assim como esclarecer a importância da localização nucleolar frequentemente verificada para a S-HDAG (Cunha *et al.*, 1998). Ambas as proteínas identificadas, são proteínas cujas propriedades não se encontram muito exploradas. A proteína 2 de ligação a EBNA1 (EBP2) é um interactuante conhecido do antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr (EBNA1), tendo sido associada a algumas fases da replicação do vírus (Shire *et al.*, 1999). A proteína contendo um domínio ribossomal L1 foi identificada numa pesquisa YTH, como interactuante da nucleostemina e provou contribuir para a localização nucleolar desta última (Meng *et al.*, 2006).

A pesquisa também levou à identificação de proteínas que aparentemente não apresentam nenhuma relação com os mecanismos de replicação e patogénese do HDV. Este é o caso da proteína p180 e também das proteínas envolvidas em etapas energéticas do metabolismo celular, 17 β hidroxisteróide desidrogenase tipo 4 e tipo 6, duas enzimas que regulam as concentrações de esteróides e androgénoides (Baker, 2001). A proteína p180 foi originalmente considerada como uma proteína de ligação a ribossomas, localizada na membrana do retículo endoplasmático (Savitz e Meyer, 1990). Mais tarde, Ogawa-Goto e colaboradores detectaram uma interacção entre esta proteína e partículas de citomegalovírus (HCMV), tendo sido sugerido o envolvimento da p180 no transporte

intracelular de cápsides de HCMV (Ogawa-Goto *et al.*, 2002). Os mesmos autores, na tentativa de elucidar a função da p180, reportaram a presença de um domínio único de ligação a microtúbulos na proteína p180, capaz de mediar de interações entre o retículo endoplasmático e o citoesqueleto (Ogawa-Goto *et al.*, 2007).

É de salientar o facto de nenhuma das proteínas previamente descritas como interectuantes do S-HDAg ter sido identificada no estudo aqui apresentado. Esta observação evidencia outra das desvantagens do sistema YTH, a ocorrência de falsos negativos, que pode ser consequência da ausência de modificações pós-traducionais, assim como da ocorrência de conformações proteicas distintas das observadas em células animais, tanto para a S-HDAg como para as proteínas da biblioteca (Ito *et al.*, 2001). Por outro lado, também limitações ao nível do conteúdo da biblioteca de cDNA podem levar à identificação de falsos negativos, nomeadamente pela ausência de algumas das proteínas cuja interacção com o S-HDAg foi previamente descrita.

No que respeita ao procedimento YTH realizado para a detecção de interações entre o domínio NLS dos HDAGs, o objectivo principal foi a identificação de proteínas envolvidas no processo de importação nuclear. Actualmente, o único estudo realizado na tentativa de identificar os receptores de transporte intervenientes no processo de importação nuclear do HDAG, mostrou que a importina- $\alpha 2$ se liga especificamente ao HDAG, sendo esta interacção dependente da presença da sequência de aa de 67 a 88 do HDAG (Xia *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1992). Estas evidências sugerem o envolvimento da importina- $\alpha 2$ no mecanismo de importação nuclear de HDAG, no entanto, a hipótese nunca foi confirmada *in vivo*. Por outro lado, o estudo em questão baseou-se no facto, admitido na data do estudo, de que o HDAG possuía duas sequências capazes de promover a importação nuclear, sendo a segunda sequência bipartida e compreendida entre os aa 67 a 88 (Xia *et al.*, 1992). Entretanto, em 2008, foi publicado um novo estudo que demonstrou que a sequência do HDAG compreendida entre os aa 66 a 75 era suficiente para permitir a importação do HDAG (Alves *et al.*, 2008). Actualmente admite-se que o NLS do HDAG é monopartido e constituído pela sequência contínua de 10 aa ⁶⁶EGAPPAKRAR⁷⁵.

Face aos novos dados, foram realizados estudos (Alves *et al.*, 2008) que visaram a identificação de proteínas com capacidade de ligação ao NLS do HDAG, constituído pelos aa 66 a 75. Nestes ensaios, utilizou-se uma abordagem prática que consistiu na selecção de proteínas com afinidade para o NLS do HDAG, a partir de extractos totais de células de hepatoma humano, por cromatografia de afinidade, seguida de análise por espectrometria

de massa para identificação das proteínas seleccionadas. Ainda que a combinação das técnicas de cromatografia de afinidade e espectrometria de massa permita estudar os complexos proteicos em condições muito semelhantes às fisiológicas e no organismo ou tipo de célula mais relevante para o estudo (Gringas *et al.*, 2007), não foi possível identificar nenhuma proteína directamente envolvida no processo de importação nuclear.

Neste contexto, no presente trabalho, recorreu-se ao sistema YTH, com o objectivo de identificar factores celulares envolvidos na importação nuclear dos HDAGs. A proteína DNA-BD/3NLS-HDAG, formada por três cópias em *tandem* do NLS do HDAG fundidas com o DNA-BD de GAL4, foi utilizada para pesquisar interações com proteínas alvo, presentes na biblioteca de proteínas de fígado humano. Pelo facto do NLS do HDAG ser uma sequência de dimensão reduzida, à semelhança dos estudos anteriores (Alves *et al.*, 2009), optou-se por utilizar três repetições deste sinal. Note-se que, nesses estudos, provou-se a capacidade do péptido formado pelas três cópias do NLS do HDAG, ser reconhecido pelas proteínas responsáveis pela importação nuclear. De facto, a análise da distribuição intracelular da proteína citoplasmática *c-myc*-PK fundida com três cópias do NLS, permitiu detectá-la exclusivamente no núcleo de células transfectadas, demonstrando, deste modo, a funcionalidade da sequência 3NLS-HDAG como NLS.

O procedimento YTH foi semelhante ao realizado para a S-HDAG, tendo sido pesquisados 1.73×10^8 clones presentes na biblioteca de cDNA de hepatócito humano, dos quais 161 activaram os três genes repórteres. No entanto, neste caso, não se procedeu à extracção de plasmídeos de todos os clones positivos. Seleccionaram-se 20 plasmídeos da biblioteca isolados dos clones positivos que foram submetidos a análise por sequenciação. Foi possível identificar 8 proteínas diferentes, algumas das quais proteínas mitocondriais e ribossomais, que são, tal como referido anteriormente, falsos positivos comuns. Para além destas proteínas identificaram-se outras, aparentemente com pouco interesse do ponto de vista do fenómeno de importação nuclear (Subunidade 5 do complexo signalossoma COP9, Serina hidroximetiltransferase 17 β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 4, candidato 2 do desenvolvimento da mesoderme).

Num dos clones positivos, obteve-se um plasmídeo pGADT7-Rec contendo um fragmento de cDNA com cerca de 1200 bps, cuja sequenciação levou à identificação da proteína carioferina- α -4. Esta proteína é uma importina responsável pelo reconhecimento de NLSs de proteínas presentes no citoplasma e iniciando o processo de importação para o núcleo (Goldfarb *et al.*, 2004). Face ao evidente envolvimento desta proteína na etapa que se

pretende estudar, optou-se por explorar a sua interacção com o S-HDAg, cujos pormenores serão apresentados no capítulo VI, deste documento.

Apesar das limitações intrínsecas do sistema YTH, os resultados obtidos neste trabalho parecem confirmar tratar-se de uma ferramenta útil na identificação de novas proteínas que interagem com proteínas de interesse. Obviamente, é necessário algum cuidado na análise de resultados, sendo sempre indispensável uma discussão acerca da significância biológica das interacções detectadas assim como validar as interacções detectadas em condições fisiológicas.

Na impossibilidade de estudar todas as interacções detectadas, optou-se por validar e aprofundar as interacções do S-HDAg e as proteínas HuR, hnRNPc e EBP2, assim como da carioferina- α -4 e o seu possível envolvimento na importação nuclear das RNP de HDV. Estes estudos serão descritos nos próximos capítulos.

CAPÍTULO III

hnRNP1/C2: um novo interactor da S-HDAg

III.1 INTRODUÇÃO

III.1.1 A FAMÍLIA DAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEAS NUCLEARES (hnRNPs)

As ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) são uma família de proteínas nucleares bastante abundantes que se encontram envolvidas em várias etapas da biogénese de mRNA. Pertencem à grande família das proteínas de ligação a RNA (RBP), apresentando motivos de ligação a RNA (RBD) constituídos por sequências de aa muito conservadas entre os vertebrados (Dreyfuss *et al.*, 1993).

A designação de hnRNPs deriva do facto destas proteínas se ligarem a transcritos nascentes da RNA polimerase II, empacotando-os em partículas constituídas por várias proteínas e RNAs, as partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (partículas hnRNP; Krecic e Swanson, 1999). Aparentemente, o facto dos transcritos de mRNA se encontrarem empacotados em partículas hnRNPs altera a sua função e estrutura, sendo as proteínas hnRNPs presentes nestas partículas, responsáveis por desencadear várias etapas do metabolismo dos mRNAs, incluindo o *splicing*, o transporte de mRNA ou a tradução (Dreyfuss *et al.*, 2002).

A família das hnRNPs é numerosa e composta por várias proteínas com características diferentes. Em células humanas foram descritas pelo menos 20 proteínas mais abundantes que se encontram designadas de A1 a U. Para muitas destas proteínas conhecem-se também várias isoformas resultantes de processos de *splicing* alternativo (Dreyfuss *et al.*, 1993).

III.1.2 hnRNP

A hnRNP é a proteína mais abundante da família das hnRNPs (Dreyfuss, 1986; Dreyfuss *et al.*, 1993). Juntamente com as hnRNPA e B, as hnRNP são denominadas de hnRNP “centrais” porque são as proteínas que se encontram em maior concentração nas partículas hnRNPs (Lothstein *et al.*, 1985).

A hnRNP consiste em duas isoformas, a hnRNP1 e C2, sendo a hnRNP2 expressa em níveis cerca de três vezes inferiores aos da hnRNP1 (Koloteva-Levine *et al.*, 2002). As duas isoformas agrupam-se num heterotetramero [(C1)₃(C2)] (McAfee *et al.*, 1996) que, por sua vez, constitui aproximadamente 1/3 da massa proteica das partículas hnRNP (Barnett *et al.*, 1989).

III.1.2.1 ESTRUTURA

As isoformas da hnRNP, produzidas por um mecanismo de *splicing* alternativo, diferem entre si apenas numa sequência de 13 aa que a hnRNP2 possui adicionalmente, na região central (Burd *et al.*, 1989). Com excepção desta sequência de 13 aa, e que aparentemente torna a sua ligação a RNA mais específica do que no caso da hnRNP1 (Koloteva-Levine *et al.*, 2002), as duas isoformas são estruturalmente semelhantes, tendo sido identificados os mesmos domínios em ambas.

Estudos independentes levaram à identificação de vários domínios funcionais distintos na hnRNP, sendo que alguns dos domínios se sobrepõem ao longo da sequência da proteína (figura III.1.2.1).

O domínio fundamental da hnRNP e que permite a sua classificação como RBP é o RBD. Este domínio também é conhecido como motivo de reconhecimento de RNA (RRM) e compreende cerca de 80 aa da extremidade N-terminal da hnRNP (Burd e Dreyfuss, 1994). Na região central, foi identificado um domínio básico semelhante a fecho de leucinas (bZLM) que inclui uma região rica em aa básicos, adjacente a um motivo de fecho de leucinas. Segundo McAfee e colaboradores, este domínio representa uma classe nova de motivo de ligação a RNA que pode funcionar independentemente ou em conjunto com o RBD localizado na região N-terminal (McAfee *et al.*, 1996). Na região central da hnRNP foi também identificado um domínio de oligomerização C1-C1 (CID), envolvido na associação das proteínas em tetrameros (Wan *et al.*, 2001).

A região C-terminal apresenta um domínio ácido auxiliar (aAUX) que parece estar envolvido em interacções proteicas (Görlach *et al.*, 1992; McAfee *et al.*, 1996). Foi ainda sugerido que os 40 aa finais podem desempenhar funções de NES. No entanto, também foi identificado um sinal de retenção nuclear (NRS) na região compreendendo os aa 88 a 165 (Nakielnny e Dreyfuss, 1996).

Pelo facto de apresentar tanto um NES como um NRS, a localização celular da hnRNP foi alvo de diversos estudos. Nakielnny e colaboradores obtiveram evidências de que a função do NRS prevalece sobre a do NES na maioria das condições celulares, sugerindo que a proteína permanece no núcleo (Nakielnny e Dreyfuss, 1996). No entanto, outros grupos verificaram que perante determinadas condições celulares a hnRNP pode desempenhar funções no citoplasma. Por exemplo, Kim e colaboradores descrevem que a hnRNP se desloca parcialmente do núcleo para o citoplasma na fase G2/M do ciclo celular (Kim *et al.*, 2003). Igualmente, o facto de ter sido demonstrado o envolvimento da hnRNP na regulação da

tradução de vários genes citoplasmáticos (Holcík e Korneluk, 2000; Kim *et al.*, 2003), sugere que esta proteína desempenha funções no citoplasma.

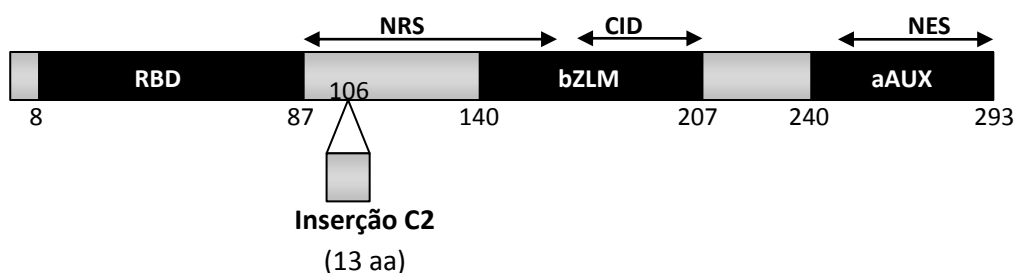


Figura III.1.2.1: Representação esquemática dos domínios funcionais identificados na hnRNP C2. Na região N-terminal e central da sequência peptídica, a proteína contém um domínio de ligação a RNA (RBD), um sinal de retenção nuclear (NRS), um domínio de oligomerização (CID) e um domínio básico semelhante a fecho de leucinas (bZLM). Na extremidade C-terminal contém um sinal de exportação nuclear (NES) e um domínio ácido auxiliar (aAUX).

II.1.2.2 FUNÇÃO

A hnRNP C2 é uma proteína multifuncional que se encontra envolvida numa variedade de processos do metabolismo de mRNAs, incluindo *splicing*, poliadenilação, modulação da estabilidade e tradução (Krecic e Swanson, 1999). Para além da capacidade de ligação a RNA, que a classifica como uma RBP, a hnRNP C2 também se pode ligar a DNA assim como a outras proteínas, tendo-lhe sido associados múltiplos genes alvo, que compreendem diferentes categorias.

A expressão de algumas proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular e processos apoptóticos foi descrita como alvo de regulação pela hnRNP C2, sugerindo o seu envolvimento nestes processos. Este é o caso da proteína XIAP (inibidor da apoptose ligado ao cromossoma X), um inibidor da cascata de caspases, (Holcík *et al.*, 2003) e também de c-myc, uma proteína codificada por um proto-oncogene, envolvida na proliferação, diferenciação, apoptose e regulação do ciclo celular (Kim *et al.*, 2003). Em ambos os casos, a hnRNP C2 foi demonstrada como interactor de sequências IRES (local de entrada interno no ribossoma) presentes nos mRNAs de XIAP ou c-myc, aumentando a frequência da sua tradução. Assim, estes resultados sugerem que a hnRNP C2 pode actuar como um factor de sobrevivência da célula, pela interacção directa entre o mRNA de genes responsáveis pela indução do ciclo celular e prevenção da apoptose (Carpenter *et al.*, 2006).

Existem também evidências de que a hnRNP C2 se encontra directamente envolvida em etapas de respostas celulares a danos em DNA. Análises proteómicas identificaram a hnRNP C2 como uma proteína que responde a danos em cadeias duplas de DNA cromossomal causados pela radiação gama, ligando-se à cromatina em células Hela (Lee *et al.*, 2005). Foi

também sugerido o envolvimento da hnRNP na manutenção da integridade dos telómeros, dada a sua capacidade para interagir com a enzima telomerase (Ford *et al.*, 2000).

Pelo facto de ter sido implicada na expressão de proto-oncogenes e de outros genes cujos produtos estão envolvidos na divisão celular e apoptose, na biogénese de telómeros e na reparação de DNA, tem sido sugerida a importância da hnRNP no desenvolvimento e progressão tumorais (Giles *et al.*, 2003; Carpenter *et al.*, 2006).

Face às diversas funções a que lhes estão associadas, as hnRNPs encontram-se entre as proteínas celulares mais envolvidas nos processos de infecção viral. Até à data, conhecem-se várias interacções entre a hnRNP e diversos componentes virais. Por exemplo, no vírus Epstein-Barr (EBV), duas proteínas virais, M e SM, são admitidas como facilitadoras do processo de poliadenilação do mRNA da polimerase de DNA do EBV. Foi demonstrado que estas proteínas têm capacidade de se ligar a hnRNP e hnRNP1/B2, tendo sido sugerido que facilitam o processamento do pré-mRNA, que de outro modo é ineficiente (Key *et al.*, 1998).

Também no que respeita ao vírus influenza e dengue, foram identificadas interacções entre proteínas virais e a hnRNP (O'Neill e Palese, 1995; Noisakran *et al.*, 2008). Igualmente, conhecem-se interacções entre a hnRNP e os genomas de outros vírus de RNA. Este é o caso do HCV e do poliovírus. Em ambos os casos, a interacção do RNA viral com a hnRNP parece ser fundamental para a iniciação e regulação da replicação viral (Gontarek *et al.*, 1999; Brunner *et al.*, 2004). Apesar das várias interacções detectadas, o seu significado ainda não é conhecido e, na maioria dos casos, têm sido propostos mecanismos distintos para cada ciclo de replicação viral.

III.2 OBJECTIVOS

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo:

- Investigar a interacção entre a S-HDag e a hnRNP, previamente identificada pelo sistema YTH.

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1 SISTEMA YTH

No capítulo II, o sistema *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid* foi utilizado para pesquisar interacções entre a proteína S-HDAg e uma biblioteca de cDNA de fígado humano (Clontech). Para prosseguir o estudo e confirmar as interacções seleccionadas, foi utilizado o mesmo sistema comercial.

III.3.1.1 SEQUENCIAÇÃO DE DNA

Na pesquisa YTH descrita no capítulo II, a utilização do *primer* T7 em reacções de sequenciação permitiu determinar a identidade dos fragmentos de cDNA inseridos em vectores pGADT7-Rec. De modo a obter a sequência completa dos fragmentos, uma vez que o *primer* T7 apenas permite a determinação da região adjacente à sequência codificante para o DNA-BD, foram realizadas novas reacções de sequenciação com a utilização do *primer reverse 3' AD sequencing* (AGATGGTGCACGATGCACAG). Este *primer* emparelha numa região localizada a jusante do local de inserção do fragmento de cDNA, permitindo a determinação da sequência codificante para a região C-terminal das proteínas expressas.

III.3.1.2 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LEVEDURA

A preparação de extractos proteicos de clones positivos foi efectuada seguindo o protocolo descrito em II.3.1.6.1 (método ureia/SDS). Para detectar as proteínas pretendidas, os extractos foram submetidos a análise por *Western blot*, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3, com utilização do anticorpo monoclonal anti-hnRNPC de murganho (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:1000 em PBS com 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

III.3.1.3 CONSTRUÇÃO DE MUTANTES DE DELECÇÃO DA S-HDAg NO PLASMÍDEO pAS2-1

Com o objectivo de mapear a região da S-HDAg necessária para a sua interacção com as proteínas identificadas na pesquisa YTH, construíram-se três mutantes de deleção da S-HDAg. Assim, diferentes regiões da ORF da S-HDAg foram clonadas no vector pAS2-1, para construir os três plasmídeos pretendidos: pAS2-1/S-HDAg(1-62), pAS2-1/S-HDAg(63-97) e pAS2-1/S-HDAg(98-195). Cada um destes plasmídeos deve permitir a expressão de proteínas

de fusão constituídas pelo domínio de ligação ao DNA de GAL4 (DNA-BD) e pelas sequências de aa do S-HDAg, indicadas dentro dos parêntesis.

Os fragmentos de cDNA, codificantes para as três sequências polipeptídicas dos mutantes de deleção do S-HDAg, foram obtidos por PCR, utilizando o plasmídeo pGEX-6P-2/S-HDAg (Mota e Cunha, 2003) como DNA molde e pares de *primers* específicos, cujas sequências são apresentadas na tabela III.3.1.1. Os *primers forward* e *reverse* utilizados possuem sequências extra com locais de restrição *MunI* e *Sall*, respectivamente, nas extremidades 5'. Estes locais foram introduzidos de modo a permitir a criação de extremidades coesivas nos fragmentos de cDNA, compatíveis com as resultantes da digestão do plasmídeo pAS2-1 com as enzimas *EcoRI* e *Sall*.

O processo de clonagem, incluindo as reacções de PCR, hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação, seguiu o procedimento previamente descrito em II.3.1.3.

Tabela III.3.1.1: Sequência dos *primers* sintéticos utilizados na preparação de fragmentos de DNA, a clonar no vector pAS2-1, para obtenção dos plasmídeos indicados.

CAATTG - local de reconhecimento da enzima *MunI*; GTCGAC - local de reconhecimento da enzima *Sall*.

Plasmídeo		Sequência nucleotídica (5'→3')	Dimensão (bp)
pAS2-1/S-HDAg(1-62)	<i>Forward</i>	TTATCAATTGATGAGCCGGTCCGAGTCG	204
	<i>Reverse</i>	TTATGTCGACCCATCCTTATCCTTCTTTCCGAG	
pAS2-1/S-HDAg(63-97)	<i>Forward</i>	TTATCAATTGCTGGATAAGGATGGAGAGGGG	116
	<i>Reverse</i>	TTATGTCGACGTCGGTGAATCCTCCCCTG	
pAS2-1/S-HDAg(98-195)	<i>Forward</i>	TTATCAATTGAAGGAGAGGCAGGATCACCG	310
	<i>Reverse</i>	TTATGTCGACCTATGGAAATCCCTGGTTTCCC	

III.3.1.4 (Co)TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

Na tentativa de confirmar as interacções detectadas na pesquisa YTH e também de identificar as regiões da S-HDAg intervenientes nessas interacções, realizaram-se reacções de co-transformação em células de levedura AH109 de *S. cerevisiae* (MATa), com diferentes combinações de plasmídeos.

A introdução de DNA plasmídico em células de levedura foi efectuada segundo o método de LiAc, previamente descrito em II.3.1.4. Nos procedimentos de co-transformação, para a introdução simultânea de dois plasmídeos distintos, a mesma quantidade (200ng) dos dois plasmídeos foi utilizada na mistura de transformação.

No final dos procedimentos de transformação, as suspensões celulares foram plaqueadas em meio SD suplementado com aa essenciais. Na selecção dos plasmídeos pAS2-1 ou/e

pGADT7-Rec, foi utilizado meio SD sem triptofano ou/e leucina, respectivamente (SD/-Trp, SD/-Leu e SD/-Trp/-Leu). Para analisar a activação dos genes repórteres, utilizou-se meio SD sem triptofano, leucina, adenina e histidina e suplementado com X- α -Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal).

III.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

III.3.2.1 VECTORES

Na produção de proteínas de fusão com a glutathione S-transferase (GST) ou com seis resíduos de histidina consecutivos (poli-Hist), foram utilizados os vectores de expressão procariota pGEX-6P-2 (GE Healthcare) e pET28c (Novagen), respectivamente.

O plasmídeo pET28c é um vector de expressão procariota que permite a expressão de proteínas de fusão com poli-Hist. As proteínas de fusão são expressas sob o controlo do promotor indutível *lacI*.

O plasmídeo pGEX-6P-2 possui um promotor indutível *tac* que controla a expressão de proteínas de fusão com GST assim como um local de clivagem específico para a protease PreScission que permite a separação das proteínas de interesse do domínio GST.

O plasmídeo pACYC-RP possui cópias dos genes que codificam tRNAs raros em *E. coli* (*argU* e *proL*).

III.3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

O plasmídeo pET28c/hnRNP foi construído para permitir a expressão da proteína hnRNP, como fusão com seis resíduos de histidina (His₆/hnRNP).

O cDNA correspondente à ORF da hnRNP foi obtido por PCR, tendo sido utilizado como molde o cDNA de hnRNP clonado no plasmídeo pOTB7 (IMAGE clone #3354131; Geneservice Ltd, UK). Os *primers forward* 5'TTATCAATTGGGATGGCCAGCAACGTTACC3' e *reverse* 5'TTATGTCGACGTGCTTAAGAGTCATCCTCGCC3' foram utilizados. Estes *primers* possuem sequências extra com locais de restrição nas extremidades 5' de tal modo que o produto de PCR resultante possa ser digerido pelas enzimas *MunI* e *SalI* e introduzido no vector pET28c, no local de restrição compatível *EcoRI/SalI*.

Os métodos experimentais para construção do plasmídeo, que incluem reacções de PCR, hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação, foram realizados de acordo com o previamente descrito em II.3.1.3.

III.3.2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

Os vectores pGEX-6P-2/S-HDAg e pACYC-RP foram usados para co-transformar células de *E. coli* BL21 (Stratagene) e o vector pET28c/hnRNPC foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene). Colónias individuais obtidas em ambas as situações foram inoculadas em meio 2xYTA [16g/l triptona, 10g/l extracto de levedura, 5g/l NaCl] e incubadas durante a noite, com agitação a 250 rpm. As culturas líquidas saturadas foram diluídas na razão 1:6 e incubadas a 37°C, com agitação a 100 rpm, durante 2 horas. Seguiu-se indução da expressão das proteínas de fusão, pela adição de Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido (IPTG; Sigma-Aldrich), na concentração final de 1mM. As culturas com IPTG foram incubadas por 2 horas adicionais, nas condições anteriores e, após terem sido transferidas para tubos de polipropileno de 50ml, foram centrifugadas a 2000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em PBS e procedeu-se à lise celular pelo método de congelação/descongelação. Assim, a suspensão celular, tratada com lisozima (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0.1mg/ml, durante 10 minutos, foi colocada em azoto líquido até congelar e em seguida descongelada num banho a 37°C. Repetiu-se este procedimento 3 vezes e, no final, adicionou-se Dnase I (Roche), na concentração final de 10 μ g/ml para degradar o DNA libertado durante a lise celular. Após incubação de 20 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes guardados a -80°C.

De modo a confirmar a presença das proteínas de fusão pretendidas, GST/S-HDAg e His₆/hnRNPC, nos extractos celulares, realizou-se análise por *Western blot*, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3. Amostras de extractos celulares foram diluídas em tampão de amostra contendo SDS [6x tampão de amostra contendo SDS: 0.35M Tris-HCl pH 6.8, 10.28% SDS, 36% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.012% azul de bromofenol] e desnaturadas por aquecimento a 100°C durante 5 minutos. Após separação electroforética e transferência para membranas de nitrocelulose, as proteínas de fusão com GST ou poli-Hist foram detectadas por incubação com o anticorpo monoclonal de cabra conjugado com peroxidase (BioRad) ou o anticorpo monoclonal anti-Hist de murganho (Sigma-Aldrich) diluídos 1:5000 ou 1:3000, respectivamente, em PBS com 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

III.3.2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína GST/S-HDAg foi realizada por cromatografia de afinidade, com utilização de colunas comerciais GSTrap (GE Healthcare). As colunas GSTrap encontram-se

pré-empacotadas com uma matriz de glutathione, de tal modo que as proteínas com afinidade para glutathione, como é o caso da GST, ficam ligadas à matriz enquanto as restantes proteínas nos extractos totais são eluídas. Durante este processo, a proteína S-HDAg foi separada da GST, por clivagem com a protease PreScission (GE Healthcare).

O procedimento de purificação foi de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a coluna de purificação foi equilibrada com 5 volumes de PBS e em seguida adicionaram-se os extractos proteicos bacterianos, contendo GST/S-HDAg, a uma velocidade reduzida (0.1ml de extractos por minuto), para otimizar a quantidade de GST/S-HDAg ligada a glutathione. A coluna foi lavada com 15 volumes de PBS, para remover as proteínas não ligadas à matriz de glutathione, seguindo-se adição de 15ml de solução tampão de clivagem da protease PreScission [50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT]. A protease PreScission foi então adicionada à coluna (120U num volume final de 1ml de solução tampão de clivagem da protease) e incubada a 4°C, durante a noite. A proteína S-HDAg foi eluída com 3ml de solução tampão de clivagem, recolhendo-se alíquotas com cerca de 250µl. Entretanto, a coluna foi lavada com PBS e, para eluir a GST, adicionou-se glutathione reduzida (10mM glutathione reduzida em 50mM Tris-HCl pH 8.0).

As proteínas eluídas foram submetidas por *SDS-PAGE* e analisadas por coloração com azul brilhante de Coomassie e *Western blot*. As fracções mais concentradas foram seleccionadas e sujeitas a diálise contra 1000 volumes de PBS, a 4°C durante a noite.

A concentração da proteína S-HDAg purificada foi determinada pelo método de Bradford, tendo sido utilizado o kit comercial *BioRad Protein Assay* (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante.

III.3.3 *BLOT OVERLAY*

Nos ensaios de *blot overlay* utilizaram-se extractos proteicos bacterianos contendo a proteína His₆/hnRNP (II.3.2.2). Amostras sucessivamente mais concentradas destes extractos foram aplicadas em poços consecutivos de géis de 12% poliacrilamida e submetidas a separação por *SDS-PAGE*. Após electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e procedeu-se ao bloqueio com PBS contendo 5% leite magro (p/v) e 0.1% Tween 20. Seguiu-se incubação durante 2 horas com 40µg de S-HDAg previamente purificada (II.3.2.3), com agitação, à temperatura ambiente. Efectuaram-se três lavagens de 15 minutos com PBS contendo 2% leite magro (p/v) e 0.05% Tween 20 e, em seguida, procedeu-se à detecção do S-HDAg por incubação com anticorpo primário

policlonal de coelho anti-HDAg B3 e anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com peroxidase (Biorad), ambos diluídos 1:5000. A revelação da membrana foi efectuada com um sistema quimioluminescente (ECL; GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

III.3.4 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Neste trabalho utilizaram-se duas linhas celulares, a linha celular Huh7, derivada de hepatoma humano, e a linha celular Huh7-D12, que resulta da transfecção estável da linha celular Huh7 com o plasmídeo pSVL(D3) (Kuo *et al.*, 1988). Deste modo, a linha Huh7-D12 possui várias cópias do cDNA do HDV integradas no seu genoma, expressando constitutivamente RNPs virais.

As linhas celulares foram cultivadas em monocamada, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Invitrogen). O meio de cultura utilizado na linha celular Huh7-D12 foi suplementado com 200µg/ml Geneticina (G418; Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂.

III.3.5 TRANSFECCÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Nos procedimentos de transfecção, as células Huh7 foram cultivadas em frascos de 25cm², até atingirem uma confluência de aproximadamente 50%. Para a introdução de DNA plasmídico nas células foi utilizada uma mistura comercial de lípidos catiónicos (FuGENE® 6 Transfection Reagent; Roche). Para cada transfecção utilizaram-se 1µg de DNA e 6µl do reagente de transfecção, de acordo com as especificações do fabricante. O reagente de transfecção foi diluído em meio de cultura sem soro e em seguida adicionou-se o DNA plasmídico. A mistura foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente adicionada cuidadosamente às células. Após transfecção, as células foram incubadas nas condições de crescimento apropriadas, descritas em III.3.4. O período de incubação variou entre 24 e 48 horas, conforme o tipo de ensaio.

III.3.6 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Os extractos proteicos de células eucariotas, para análise por *Western blot* ou para ensaios de co-imunoprecipitação, foram obtidos a partir de células Huh7 ou Huh7-D12 cultivadas em caixas de 25 ou 75cm².

Para a preparação de amostras a analisar por *Western blot*, as células Huh7 ou Huh7-D12 foram tripsinizadas e recolhidas em meio de cultura. Os sedimentos celulares foram recolhidos, por centrifugação a 800 rpm durante 10 minutos, e ressuspensos em 60µl de tampão de amostra contendo SDS. Os ácidos nucleicos foram digeridos pela adição de 378U da endonuclease benzonase (Sigma-Aldrich), com incubação à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Finalmente, as proteínas presentes nas amostras foram desnaturadas por aquecimento a 100°C, durante 5 minutos, aplicadas em géis de 12% poliacrilamida proteínas e analisadas por *Western blot*.

Para a preparação de extractos a utilizar nos ensaios de co-imunoprecipitação, as células foram tripsinizadas e recolhidas em meio de cultura. Juntaram-se as suspensões celulares de 6 caixas de 75cm² e centrifugaram-se a 800 rpm, durante 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, procedeu-se à lise celular, ressuspendendo o sedimento em solução de lise [50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 1% Nonidet P-40 e 10% glicerol] suplementada com inibidores de proteases (Roche). Após incubação de 30 minutos em gelo, os extractos celulares foram centrifugados a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante recolhido e guardado a -80°C.

III.3.7 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Nos ensaios de co-imunoprecipitação utilizaram-se extractos celulares da linha celular Huh7-D12 (III.3.6). Estes extractos foram inicialmente pré-lavados por incubação com partículas magnéticas covalentemente ligadas a proteína G (Dynabeads Protein G; Invitrogen). Este passo teve como objectivo remover dos extractos proteicos totais, proteínas com capacidade de se ligar inespecificamente às partículas de proteína G. Alíquotas de 100µl dos extractos celulares resultantes da pré-lavagem foram incubadas, com agitação, durante 2 horas a 4°C, com 5µg de anticorpo policlonal anti-HDAgs B3. Em seguida, adicionaram-se 25µl de solução 50% (v/v) de partículas magnéticas covalentemente ligadas a proteína G e incubou-se durante 40 minutos à temperatura ambiente com agitação. No final do tempo de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e os imunoprecipitados foram ressuspensos em 3x tampão de amostra contendo SDS. Finalmente, ferveram-se as amostras durante 5 minutos e procedeu-se à separação em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE* e análise por *Western blot*, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3, com utilização do anticorpo monoclonal anti-hnRNPC de murganho (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:1000 em PBS, com 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

III.3.8 IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRECTA

A distribuição intracelular das proteínas em estudo foi analisada por imunofluorescência indirecta, de acordo com o descrito por Cunha *et al.* (1998).

Células da linha celular Huh7-D12, cultivadas em lamelas de 12 x 12 mm, foram lavadas com PBS, fixadas com uma solução de formaldeído a 3.7% e permeabilizadas com uma solução de 0.5% Triton X-100, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens com PBS contendo 0.05% Tween 20 (PBS-T) após as quais se iniciaram as incubações com os anticorpos primários e depois com os respectivos anticorpos secundários. As incubações com os anticorpos (diluídos 1:100 em PBS-T) foram efectuadas numa câmara escura húmida, à temperatura ambiente, durante cerca de 45 minutos, sendo que, entre cada incubação as células foram lavadas três vezes com PBS-T. No final das incubações realizaram-se três lavagens com PBS e procedeu-se à montagem das preparações. As lamelas foram colocadas em lâminas, sobre o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories) e seladas com verniz.

Nos ensaios de imunofluorescência indirecta dupla utilizaram-se como anticorpos primários, o anticorpo policlonal de coelho anti-HDAg B3 e o anticorpo monoclonal anti-hnRNPC de murganho. Os anticorpos secundários utilizados incluíram o anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com Texas Red (TR), ambos de Jackson ImmunoResearch Laboratories.

III.3.9 HIBRIDAÇÃO *in situ*

III.3.9.1 MARCAÇÃO DE SONDA POR *NICK-TRANSLATION*

O plasmídeo pSVL(D3) foi utilizado na síntese de sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche). Tal como mencionado anteriormente, o pSVL(D3) possui um trímero do cDNA do HDV clonado no vector de expressão eucariota pSVL, pelo que a sua marcação por *nick translation* permite obter sondas capazes de detectar os RNAs de HDV.

Nas reacções de *nick-translation* utilizaram-se 2µg de plasmídeo, 5ng de DNase I (Roche), 20U de DNA polimerase I de *E. coli* (Fermentas), 1mM DTT, 40mM dATP, dCTP e dGTP, 26mM dTTP e 14mM dig-11-dUTP em tampão de *nick-translation* [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgSO₄, 50µg/ml BSA, 0.1mM DTT], num volume final de 100µl. A mistura foi incubada a 15°C e, após 2 horas, avaliou-se a dimensão dos fragmentos de DNA, produzidos

durante a reacção, por electroforese em gel de agarose a 2%. O tamanho ideal dos fragmentos de DNA deve rondar os 200 bps, de modo a que a sonda não seja demasiado longa, dificultando a hibridação, nem muito pequena resultando em hibridações inespecíficas.

Uma vez produzida a sonda com a dimensão pretendida, adicionou-se solução de paragem [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, 0.1% azul de bromofenol e 0.5% azul de dextrano] à mistura e procedeu-se à sua purificação, para eliminar os nucleótidos não incorporados. Os fragmentos de DNA foram precipitados com a adição de 10 µg de tRNA de *E. coli*, 0.05 volumes de acetato de sódio 3M e 2.5 volumes de etanol absoluto e incubação durante 1 hora, a -20°C. Procedeu-se, de seguida a centrifugação, a 10000 rpm, durante 30 minutos a 4°C, e o DNA precipitado, presente no sedimento, foi lavado com etanol 70% (p/v), previamente arrefecido a -20°C. Seguiu-se nova centrifugação nas mesmas condições, durante 5 minutos, e o sedimento foi seco e finalmente dissolvido em solução de hibridação [50% formamida, 10% sulfato de dextrano, 2x SSC, 50mM fosfato de sódio pH 7.0].

III.3.9.2 HIBRIDAÇÃO *in situ*

Nos ensaios de hibridação *in situ*, as células foram fixadas e permeabilizadas tal como descrito para os ensaios de imunofluorescência indirecta.

As células foram posteriormente submetidas a incubações com um agente desnaturante, de modo a promover a desnaturação dos RNAs celulares e, deste modo, diminuir os emparelhamentos internos que se verificam frequentemente entre sequências complementares do RNA do HDV. Assim, utilizou-se uma solução com 70% (v/v) formamida, em 50mM fosfato de sódio, pH 7.0, durante 3 minutos a 73°C, e, posteriormente, uma solução com 50% (v/v) formamida, em 2x SSC, 50mM fosfato de sódio, pH 7.0, durante 1 minuto, a 73°C.

A sonda preparada por *nick-translation* foi previamente desnaturada, por aquecimento a 75°C durante 5 minutos, e adicionada às células. A hibridação decorreu durante 12 a 16 horas, a 37°C, em câmara escura e húmida. Na detecção da sonda marcada com dig-11-dUTP foram utilizados anticorpos, diluídos 1:100, em 4x SSC contendo 0.1% Tween 20 e 1% BSA. O anticorpo primário foi o monoclonal anti-digoxigenina conjugado com FITC (Roche) e anticorpo secundário foi o monoclonal anti-FITC conjugado com Alexas-488 (Molecular Probes). As incubações com o anticorpo primário foram efectuadas numa câmara escura e

húmida, a 37°C, durante cerca de 45 minutos, sendo que, entre as incubações as células foram lavadas três vezes com 4x SSC contendo 0.05% Tween 20, durante 5 minutos. Seguiu-se incubação com o anticorpo secundário, diluído 1:100, em 4x SSC contendo 0.1% Tween 20 e 1% BSA e as células voltaram a ser lavadas, nas mesmas condições anteriores.

Uma vez que se pretendia detectar simultaneamente os RNAs de HDV e a proteína hnRNP, utilizou-se uma combinação das técnicas de hibridação *in situ* e imunofluorescência indirecta. Assim, após a incubação com o anticorpo secundário, para detecção da sonda, as células foram lavadas, seguindo-se incubações com o anticorpo primário monoclonal anti-hnRNP de murganho e anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com TR. O restante procedimento de imunofluorescência indirecta e montagem das células coincidiu com o anteriormente descrito, em III.3.8.

III.3.10 MICROSCOPIA CONFOCAL

As amostras biológicas marcadas com fluorocromos foram analisadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss), equipado com um laser de argon (488nm), de forma a excitar FITC, e um laser hélio-neon (594nm), para excitar TR. Nas amostras com marcação dupla, as imagens, do mesmo plano focal, foram adquiridas separadamente nos dois canais e posteriormente sobrepostas. A calibração do equipamento foi realizada com o auxílio de microesferas fluorescentes (Molecular Probes) e de um filtro de banda dupla que permite a visualização simultânea das fluorescências verde e vermelha.

Os dados obtidos foram processados usando o software Zeiss 510 e as imagens foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa ImageJ (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>).

A análise quantitativa da co-localização celular entre proteínas ou proteína e RNA foi realizada pela utilização do plug-in JaCoP (Just another Colocalization Plug-in; Bolte e Cordelières, 2006). Assim, foi determinado o coeficiente de sobreposição de Mander (OC), que expressa a correlação entre a intensidade dos pixels em ambos os canais analisados. O OC varia entre 0 e 1, sendo que o valor 0 indica ausência de sobreposição e o valor 1 corresponde a uma sobreposição total (Manders *et al.*, 1992). Para cada situação foram analisadas 10 células individuais e determinados os respectivos OCs.

III.3.11 SISTEMA PARA INDUÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA

O sistema utilizado para activar o mecanismo de RNA de interferência (RNAi), de modo a silenciar a proteína hnRNP, baseia-se na utilização de vector pSIREN/RetroQ (Clontech).

Após entrada na célula, este vector permite a expressão de *short hairpin* RNAs (shRNAs), que são processados em moléculas de *small interference* RNAs (siRNA), capazes de induzir o silenciamento de um gene específico (figura III.3.11.1). A expressão de shRNAs, pelo vector pSIREN-RetroQ, é realizada a partir do promotor U6 humano, reconhecido pela RNA polimerase III. O vector pode ser introduzido em células animais por transfecção estável ou transitória e possui um gene que confere resistência à puromicina, permitindo a selecção das células transfectadas.

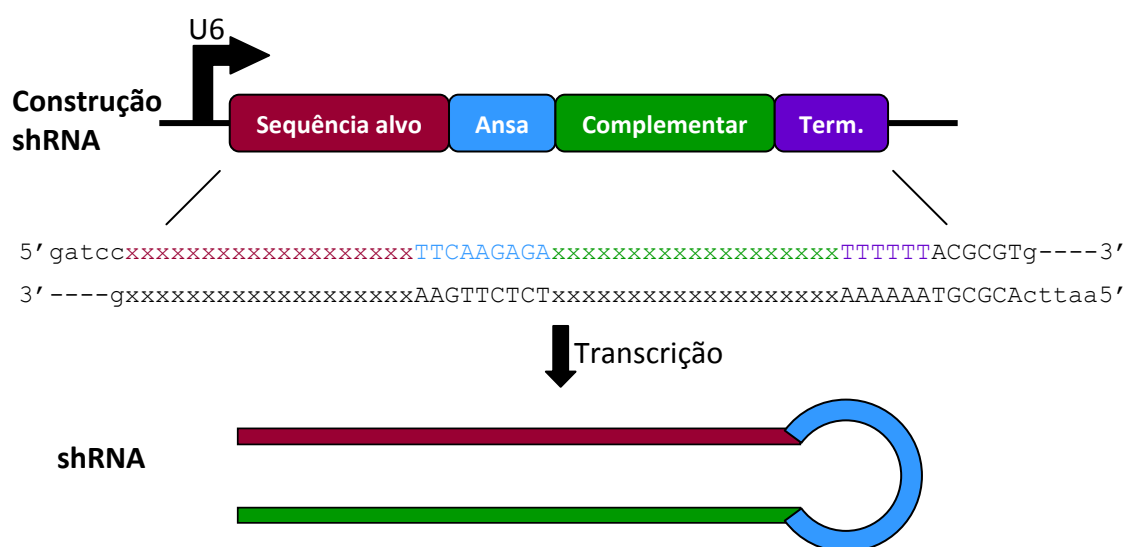


Figura III.3.11.1: Representação esquemática da estrutura dos oligonucleótidos utilizados para clonar no vector pSIREN/RetroQ e do respectivo shRNA produzido. A expressão do shRNA encontra-se sob o controlo do promotor U6 (local *Bam*HI e *Eco*RI). A cadeia simples de RNA produzida a partir do molde DNA dobra-se sobre si própria formando um shRNA.

III.3.11.1 ESCOLHA DAS SEQUÊNCIAS ALVO

As sequências alvo a utilizar, na construção do vector para a expressão de shRNA dirigidos para o mRNA de hnRNP, foram seleccionadas com recurso a uma ferramenta informática (<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do>) que permite a escolha de sequências que obedecem aos critérios estabelecidos por Elbashir (Elbashir *et al.*, 2001). Estes critérios incluem a localização das sequências a jusante de dímeros de adenina, serem constituídas por 19 nts e não conterem a mesma base azotada repetida sucessivamente 4 ou mais vezes. Para além disso, as sequências não devem apresentar uma %GC superior a 70 nem inferior a 30 nem possuir uma região GC com mais de 7 bps de extensão.

Após selecção de possíveis sequências, de acordo com a ferramenta informática, estas foram analisadas pelo software BLAST, para averiguar a existência de homologia com outros genes que não o de interesse. As sequências seleccionadas foram então analisadas por outra ferramenta informática (<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/oligoDesigner.do>) que permitiu o desenho dos oligonucleótidos a serem utilizados na clonagem em pSIREN-RetroQ: 5'gatccGCAGTAGAGATGAAGAATGTTCAAGAGACATTCTTCATCTCTACTGCTTTTTTACGCGTg3' e 5'aattcACGCGTAAAAAAGCAGTAGAGATGAAGAATGTCTCTTGAACATTCTTCATCTCTACTGCG3'. Os nucleótidos sublinhados denotam a sequência do shRNA alvo (nucleótidos no cDNA da hnRNP).

III.3.11.2 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pSIREN-RETROQ/hnRNP

O vector pSIREN-RetroQ é fornecido na forma linearizada, tendo sido previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, de modo a permitir a clonagem de uma sequência de DNA em cadeia dupla contendo a informação do shRNA a ser produzido. O desenho dos oligonucleótidos utilizados para a obtenção da sequência de DNA em cadeia dupla a clonar no pSIREN-RetroQ, assim como as respectivas sequências, foi descrito anteriormente. Os oligonucleótidos incluem extremidades coesivas resultantes da digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, de modo a permitir a inserção directa nos locais *Bam*HI/*Eco*RI do vector pSIREN-RetroQ. Para o emparelhamento dos oligonucleótidos, as cadeias simples complementares foram misturadas na razão molar 1:1 em tampão de emparelhamento [10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA]. A mistura foi submetida sequencialmente a diferentes temperaturas: 2 minutos a 72°C, 2 minutos a 37°C e 2 minutos a 25°C, para permitir o emparelhamento correcto das cadeias complementares. O fragmento em cadeia dupla resultante foi introduzido no vector pSIREN-RetroQ com o auxílio da enzima ligase de DNA do fago T4 (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. As misturas de ligação foram incubadas 1 hora à temperatura ambiente, tendo sido em seguida usadas para transformar bactérias competentes de *E. coli* DH5α, de acordo com o método do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989).

Em paralelo, foi construído um outro plasmídeo (pSIREN-RetroQ/Luc), tendo sido utilizados oligonucleótidos fornecidos pelo fabricante. Este plasmídeo permite a expressão de shRNAs dirigidos para o mRNA da luciferase, podendo ser utilizado como controlo negativo nos ensaios de silenciamento da proteína hnRNP.

A inserção dos fragmentos de DNA no vector pSIREN-RetroQ foi confirmada por digestão enzimática com a enzima *MluI* (Fermentas), para selecção do plasmídeo pSIREN-RetroQ/hnRNP, ou com a enzima *NheI*, para selecção do plasmídeo pSIREN-RetroQ/Luc. A análise da digestão enzimática foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1%.

III.3.11.3 SILENCIAMENTO DA PROTEÍNA hnRNP EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Na realização de ensaios de silenciamento da proteína hnRNP foram utilizadas células Huh7. As células foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3), de acordo com o descrito em III.3.5. O plasmídeo pSVL(D3) contém um trómero do cDNA completo do HDV, clonado no vector de expressão eucariota pSVL. Deste modo, após a transfecção com este plasmídeo, ocorre a replicação do HDV em células Huh7 (Kuo *et al.*, 1989). Após 48 horas de incubação, as mesmas células foram novamente transfectadas com o plasmídeo pSIREN-RetroQ/hnRNP, ou com o controlo negativo (pSIREN-RetroQ/Luc). Decorrido um período de incubação de 24 horas, foi adicionada puromicina ao meio, na concentração final de 2µg/mL, para seleccionar as células transfectadas com os plasmídeos pSIREN-RetroQ. As células foram mantidas em meio selectivo por 48 horas adicionais, após as quais se procedeu à preparação de amostras de extractos proteicos para quantificação relativa das proteínas pretendidas.

Realizaram-se triplicados independentes de cada ensaio e os extractos proteicos obtidos foram separados por *SDS-PAGE* em géis de 12% poliacrilamida seguidos de *Western blot*, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3, para detecção da hnRNP e HDAGs. Na detecção dos HDAGs foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho anti-HDAG B3 e na detecção da proteína hnRNP utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-hnRNP de murganho, na concentração final de 1:5000 ou 1:1000, respectivamente. Para normalizar a quantidade total de proteína presente nas amostras, utilizou-se o anticorpo policlonal produzido em coelho, que detecta a cadeia pesada da proteína *housekeeping* clatrina (Santa Cruz Biotechnology), na concentração 1:3000. A intensidade das bandas obtidas foi quantificada, com recurso ao programa ImageJ (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>).

III.4 RESULTADOS

III.4.1 A PROTEÍNA hnRNPC INTERAGE COM A S-HDAg NO SISTEMA YTH

De modo a identificar proteínas com capacidade de interagir com a S-HDAg, pesquisou-se uma biblioteca de cDNA de proteínas de fígado humano, utilizando o sistema YTH, tal como descrito no capítulo II.

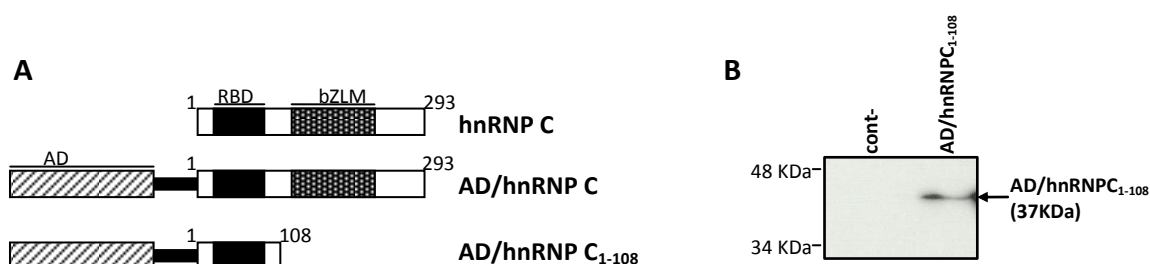
Em cinco dos clones positivos obtidos, a análise dos plasmídeos da biblioteca isolados, permitiu identificar sequências de cDNA correspondentes à proteína hnRNPC. Por sua vez, quatro destes plasmídeos continham a ORF da hnRNPC completa, originando a expressão da proteína hnRNPC como fusão com o domínio de activação GAL4 (AD/hnRNPC), enquanto o quinto plasmídeo não continha a sequência completa da ORF da hnRNPC, originando a produção de uma forma truncada da proteína hnRNPC (AD/hnRNP C₁₋₁₀₈; figura III.4.1.1).

A proteína hnRNPC é uma proteína celular de expressão ubíqua, da qual se conhecem duas isoformas, a hnRNPC1, mais abundante, e a hnRNPC2, que resulta de um processo de *splicing* alternativo, possuindo uma inserção de 13 aa (Burd *et al.*, 1989). As duas isoformas ligam-se para formar heterotetrameros [C₁₃C₂] estáveis capazes de se ligar cooperativamente a mRNA (McAfee *et al.*, 1996). Ainda que as duas isoformas apresentem sequências muito semelhantes, na pesquisa YTH efectuada neste trabalho apenas foi possível identificar a isoforma hnRNPC1 entre os clones positivos. Este resultado é consistente com o facto de a hnRNPC2 ser expressa em níveis cerca de três vezes inferiores aos da hnRNPC1, significando que se deve encontrar em menor abundância na biblioteca de cDNA utilizada. No entanto, há ainda a considerar o facto de que a forma truncada da hnRNPC identificada compreende os primeiros 108 aa da hnRNPC, que são comuns a ambas as isoformas, o que sugere que a S-HDAg também tem capacidade de interagir com a hnRNPC2.

Uma análise mais detalhada das sequências dos cinco clones positivos que codificam a proteína hnRNPC mostrou também que todos apresentam um codão *stop* em grelha, entre a sequência codificante para o AD e a da ORF da hnRNPC (barra preta fina da figura III.4.1.1). Face à presença deste codão *stop*, a expressão de proteínas de fusão AD/hnRNPC apenas é possível pela ocorrência de um mecanismo de *read-through*. De facto, este tipo de mecanismo tem vindo a ser descrito para a levedura *S. cerevisiae* (revisto em von der Haar e Tuite, 2007), e também foi observado em pesquisas YTH anteriores (Jacob *et al.*, 2000). Assim, é possível que, neste caso, uma situação semelhante esteja a ocorrer. Para averiguar

esta hipótese, prepararam-se extractos proteicos de um dos clones positivos e a presença de proteínas de fusão AD/hnRNP C foi analisada por *Western blot* com um anticorpo específico para a proteína hnRNP C. Na secção B da figura III.4.1.1 é possível observar a presença de uma banda com a dimensão esperada para a proteína AD/hnRNP C₁₋₁₀₈ (37 KDa), que está ausente nos extractos proteicos de células AH109 não transformadas. Deste modo foi possível confirmar a expressão da proteína AD/hnRNP C₁₋₁₀₈, e validar a identificação da hnRNP C como um interactor da S-HDAg, no ensaio YTH.

Figura III.4.1.1: Identificação da proteína hnRNP C como interactor da S-HDAg, no sistema YTH (A)



Representação esquemática da proteína hnRNP C e das proteínas de fusão com o AD de GAL4 identificadas nos clones positivos da pesquisa YTH (AD/hnRNP C e AD/hnRNP C₁₋₁₀₈). A proteína AD/hnRNP C₁₋₁₀₈ apresenta uma forma truncada da hnRNP C, incluindo apenas os 108 aa iniciais e ambas as proteínas contêm uma região não traduzida presente na extremidade 5' no mRNA de hnRNP C. RBD representa o motivo de reconhecimento de RNA e bZLM o domínio básico semelhante a *fecho* de leucinas, presentes em hnRNP C. **(B)** Análise por *Western blot* para detecção da AD/hnRNP C nos clones positivos. Extractos proteicos totais dos clones positivos foram preparados, separados em géis de 12% poli-acrilamida por *SDS-PAGE* e a detecção da proteína de interesse foi efectuada pelo anticorpo anti-hnRNP C. Foi analisado o extracto proteico do clone positivo correspondente à proteína AD/hnRNP C₁₋₁₀₈ e como controlo negativo utilizaram-se extractos totais de levedura AH109 não transformada (ctrl-).

III.4.2 A REGIÃO C-TERMINAL DA S-HDAg É RESPONSÁVEL PELA INTERACÇÃO COM A PROTEÍNA hnRNP C

Na pesquisa YTH, foi possível verificar que a região N-terminal da proteína hnRNP C (aa 1 a 108) interacciona com a proteína S-HDAg. Esta região da proteína hnRNP C inclui um RBD, responsável pela ligação a RNA (McAfee *et al.*, 1996).

De modo a confirmar a interacção detectada anteriormente recorreu-se novamente ao sistema YTH, pela co-transformação de *S. cerevisiae* AH109 com plasmídeos codificantes para as proteínas ou regiões em análise. Adicionalmente, o sistema YTH foi utilizado de modo a identificar as regiões da S-HDAg necessárias para a interacção com a hnRNP C. Assim, construíram-se três plasmídeos para a expressão de mutantes de deleção da S-HDAg fundidos com o DNA-BD, sendo que os mutantes de deleção foram planeados de modo a

que cada um incluísse um dos três domínios distintos identificados em S-HDAg (OLIG, NLS ou RBD; figura III.4.2.1).

A co-transformação de *S. cerevisiae* AH109 com o plasmídeo pAS2-1/S-HDAg e pGADT7-Rec/hnRNP₁₋₁₀₈ permitiu reproduzir a expressão dos genes repórteres, confirmando a interacção detectada na pesquisa YTH. Foi também possível observar que o mutante de deleção da S-HDAg que contém os aa 98 a 195, activou a expressão dos genes repórteres, enquanto, no mesmo teste, com os outros dois mutantes não se observou crescimento (figura III.4.2.1).

Com estes resultados verificou-se que a S-HDAg, por intermédio da sua região N-terminal é capaz de se ligar à hnRNP, sugerindo que esta região, que contém os domínios de ligação a RNA, é suficiente para a interacção.

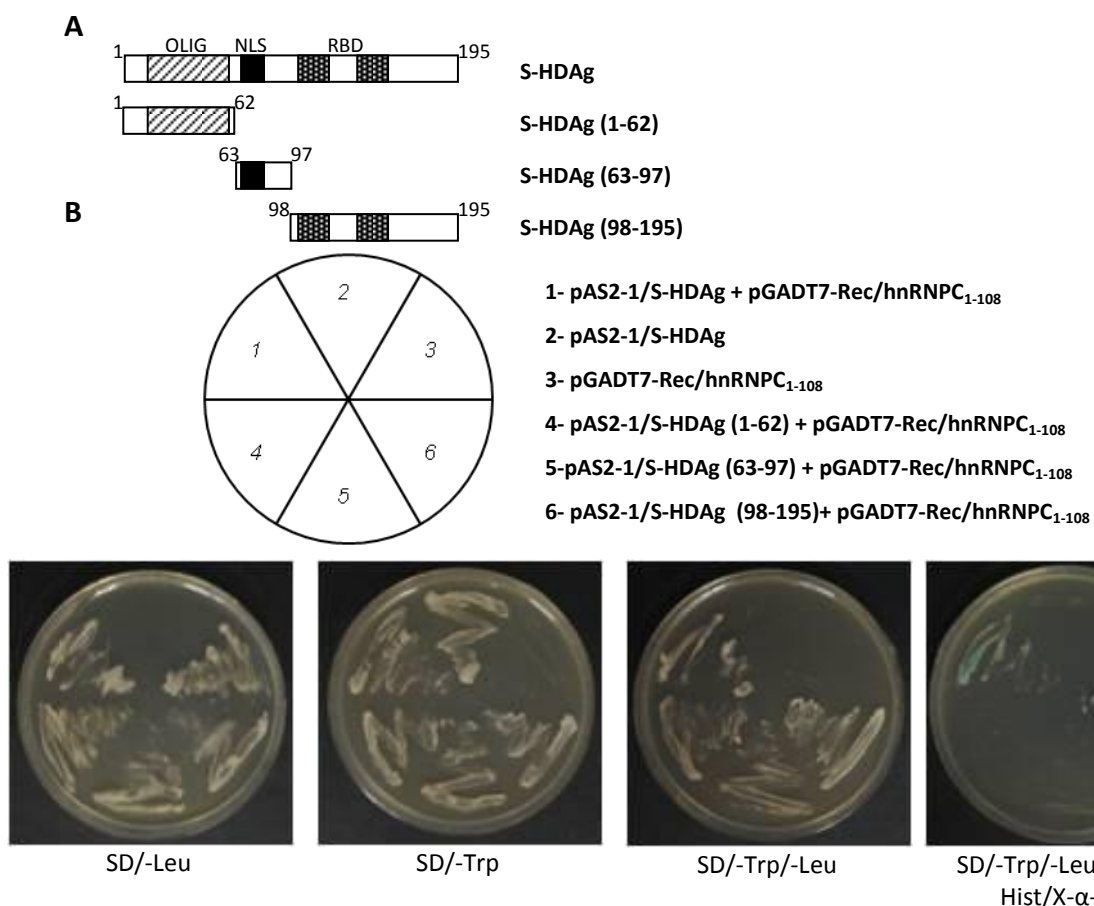


Figura III.4.2.1: Identificação dos domínios da S-HDAg envolvidos na interacção com a hnRNP pelo sistema YTH. (A) Representação esquemática dos mutantes de deleção da S-HDAg clonados em pAS2-1. OLIG, NLS e RBD indicam as regiões que contêm os domínios de oligomerização, sinal de localização nuclear e de ligação a RNA, respectivamente. (B) Células de levedura AH109 foram (co)transformadas com os plasmídeos indicados e as interacções foram testadas pela selecção de crescimento em meios sem os aa leucina e/ou triptofano (SD/-Leu, SD/-Trp e SD/-Trp/-Leu) para seleccionar as construções em pGADT7-Rec e/ou pAS2-1. A activação dos genes repórteres foi testada em meio de crescimento sem triptofano, leucina, adenina e histidina e contendo X-α-Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-Hist/X-α-Gal).

III.4.3 A PROTEÍNA hnRNPC INTERACTUA COM A S-HDAg *in vitro*

A interacção S-HDAg/hnRNPC, identificada na pesquisa YTH, foi submetida a análise *in vitro* por ensaios de *blot overlay*. Nestes ensaios avaliou-se a capacidade da proteína S-HDAg recombinante se ligar à proteína de fusão His₆/hnRNPC presente em extractos totais de *E. coli*.

III.4.3.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes His₆/hnRNPC e GST/S-HDAg foram produzidas em bactérias *E. coli* transformadas com plasmídeos apropriados para a sua expressão.

No caso da proteína His₆/hnRNPC, inicialmente construiu-se o plasmídeo pET28c/hnRNPC, por clonagem da ORF da hnRNPC no vector pET28C. Este plasmídeo foi utilizado para transformar bactérias de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP, onde a expressão da proteína His₆/hnRNPC foi induzida pela adição de IPTG. A análise da expressão da proteína pretendida foi efectuada por *SDS-PAGE* seguida de *Western blot*, com a utilização do anticorpo anti-Hist que reconhece especificamente o domínio poli-Hist. Nas amostras de extractos proteicos totais de bactérias *E. coli* transformadas com pET28c/hnRNPC, para além de uma proteína a migrar na zona dos 38 KDa, e que deverá corresponder à proteína His₆/hnRNPC, foram detectadas ainda duas bandas adicionais de dimensões inferiores (figura III.4.3.1 A). Estas bandas deverão corresponder a formas truncadas da proteína His₆/hnRNPC, pelo que não constituem problema para os ensaios de *blot overlay* a desenvolver.

Para obtenção da proteína recombinante S-HDAg foi necessário produzir a proteína de fusão GST/S-HDAg e, a partir desta, proceder à clivagem do domínio GST e consequentemente obter a proteína S-HDAg recombinante purificada. A expressão da proteína GST/S-HDAg foi induzida em bactérias *E. coli* BL21, co-transformadas com os plasmídeos pGEX-6P-2/S-HDAg e pACYC-RP. O plasmídeo pGEX-6P-2/S-HDAg codifica para a proteína GST fundida com o S-HDAg (Mota e Cunha, 2003), enquanto o plasmídeo pACYC-RP permite aumentar a produção de tRNAs raros em *E. coli*. Os lisados bacterianos obtidos foram analisados por *SDS-PAGE* e *Western blot*, tendo sido utilizado um anticorpo anti-GST para averiguar a presença da proteína GST/S-HDAg. Também neste caso foi possível observar a expressão de formas truncadas da proteína GST/S-HDAg (figura III.4.3.1 B).

Uma vez confirmada a produção da proteína GST/S-HDAg, procedeu-se à sua purificação por cromatografia de afinidade com a utilização de colunas comerciais GSTrap pré-empacotadas com uma matriz de glutationa. Durante o processo de cromatografia de afinidade, a

utilização da protease PreScission permitiu a clivagem da proteína GST/S-HDAg, separando o domínio GST da S-HDAg, com consequente obtenção da proteína S-HDAg purificada. No final do processo de purificação, a amostra foi novamente analisada por *SDS-PAGE* e *Western blot* (figura III.4.3.1 C) e em seguida submetida a diálise, tendo sido determinada a concentração da S-HDAg pelo método de Bradford.

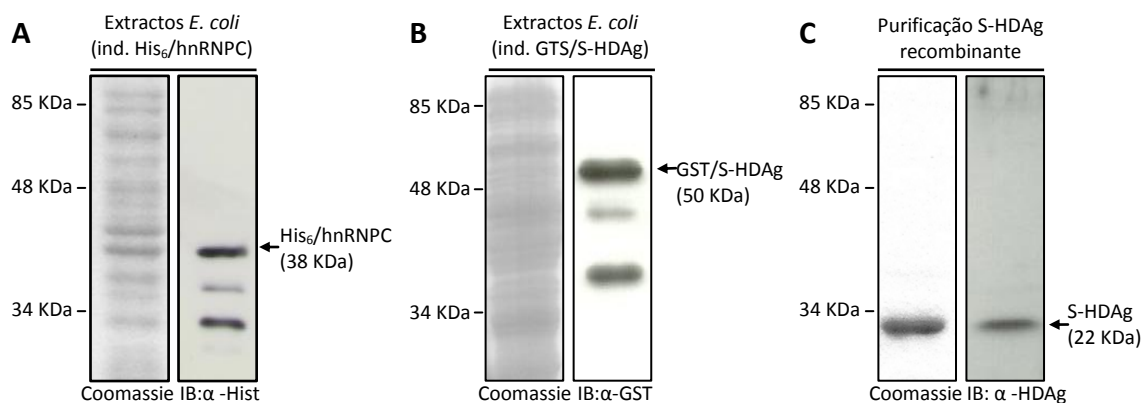


Figura III.4.3.1: Análise por *SDS-PAGE* e *Western blot* das proteínas recombinantes His₆/hnRNP, GST/S-HDAg e S-HDAg. (A e B) Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP (A) ou BL21 (B) foram transformadas com o plasmídeo pET28c/hnRNP (A) ou pGEX-6P-2/S-HDAg e pACYC-RP (B) e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas totais separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*. Os painéis da esquerda correspondem aos extractos totais de *E. coli* separados por electroforese e corados com azul brilhante de Coomassie. Os painéis da direita correspondem aos mesmos extractos, transferidos para membranas de nitrocelulose, com a detecção da proteína His₆/hnRNP pelo anticorpo anti-Hist (A) e da proteína GST/S-HDAg pelo anticorpo anti-GST (B). (C) A proteína GST/S-HDAg foi purificada de extractos totais de *E. coli* por cromatografia de afinidade, em colunas GSTrap, e o domínio GST foi separado da S-HDAg por digestão com a protease PreScission. O painel da esquerda corresponde à S-HDAg purificada por cromatografia de afinidade, submetida a *SDS-PAGE* e corada com azul brilhante de Coomassie. O painel da direita mostra a análise por *Western blot* da S-HDAg purificada, com o anticorpo anti-HDAg.

III.4.3.2 CONFIRMAÇÃO DA INTERACÇÃO S-HDAg/hnRNP POR *BLOT OVERLAY* *in vitro*

Para a realização do ensaio de *blot overlay*, quantidades crescentes de amostras de extractos de *E. coli* contendo a proteína His₆/hnRNP (entre 5 e 50 µg) foram separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE* e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada com cerca de 40 µg da proteína S-HDAg recombinante. A detecção da proteína S-HDAg que ficou ligada, realizou-se por incubação com um anticorpo policlonal específico e os resultados obtidos apresentam-se na figura III.4.3.2. Observa-se que, à medida que a quantidade de His₆/hnRNP aumenta

(painel do meio), há um aumento proporcional da proteína S-HDAg ligada (painel superior), sugerindo uma interacção *in vitro* específica entre as proteínas.

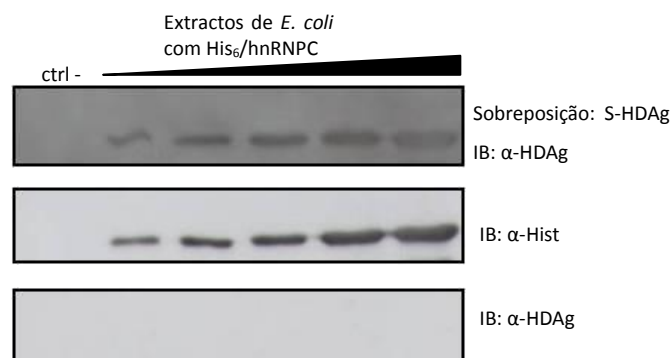


Figura III.4.3.2: Interação *in vitro* de hnRNPC e S-HDAg. Ensaio de *blot overlay*. Extractos proteicos de *E. coli* foram preparados após indução de expressão de proteínas recombinantes. Quantidades crescentes de extractos contendo His₆/hnRNPC foram separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com a proteína S-HDAg recombinante purificada. Para a detecção de S-HDAg foi utilizado o anticorpo policlonal anti-HDAgs B3 (painel superior). Como controlo negativo (ctrl-) foram utilizados extractos de *E. coli* sem His₆-hnRNPC. No painel do meio apresenta-se o resultado da análise por *Western blot* dos mesmos extractos com utilização de anticorpo anti-Hist, confirmando a presença de His₆/hnRNPC nas amostras. No painel inferior apresenta-se, como controlo negativo, o resultado da análise por *Western blot* com utilização do anticorpo anti-HDAg, comprovando que o anticorpo anti-HDAg não reconhece directamente a His₆/hnRNPC.

III.4.4 hnRNPC E HDAg INTERACTUAM *IN VIVO* EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Tendo sido confirmada a interacção *in vitro* entre S-HDAg e hnRNPC procedeu-se à análise *in vivo* desta interacção em células de hepatoma humano. Assim, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação com um anticorpo policlonal específico para HDAgs (B3) em extractos totais de células Huh7-D12. As células da linha celular Huh7-D12 apresentam várias cópias do cDNA do HDV integradas no seu genoma, expressando constitutivamente os componentes do HDV (Cheng *et al.*, 1993).

Extractos celulares obtidos de células Huh7-D12 foram imunoprecipitados com o anticorpo anti-HDAg e analisados por *Western blot* para averiguar a presença da proteína hnRNPC nos lisados celulares imunoprecipitados. Paralelamente, foram realizados dois controlos negativos que consistiram na imunoprecipitação de extractos Huh7 com o anticorpo anti-HDAg ou na imunoprecipitação de extractos Huh7-D12 na ausência de anticorpo.

Tal como se observa na figura III.4.4.1, na presença de HDAgs (células Huh7-D12) e de anticorpo anti-HDAg, é possível detectar a presença de hnRNPC na fracção

imunoprecipitada. Este resultado sugere a especificidade da ligação entre as duas proteínas uma vez que apenas na presença de HDAGs e anticorpo anti-HDAg, a proteína hnRNPC tem capacidade de permanecer nos imunoprecipitados.

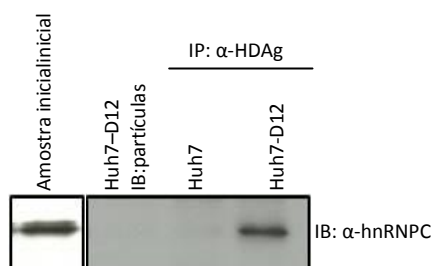


Figura III.4.4.1: Interação *in vivo* de hnRNPC e S-HDAg. Co-imunoprecipitação de hnRNPC com HDAGs. Lisados celulares de Huh7-D12 foram imunoprecipitados com anticorpo anti-HDAgs B3, separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE* e detectados com um anticorpo anti-hnRNPC. Os controlos negativos foram realizados com extractos Huh7 em substituição de Huh7-D12, ou na ausência de anticorpo anti-HDAg na imunoprecipitação.

Com esta abordagem foi possível detectar a formação de complexos hnRNPC/HDAG em células Huh7-D12, consistente com a interação *in vivo* entre as duas proteínas, em células de fígado humano.

III.4.5 A PROTEÍNA hnRNPC CO-LOCALIZA COM OS ANTIGÉNIOS E RNAs DO HDV EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

A proteína hnRNPC apresenta uma localização predominantemente nuclear e liga-se a transcritos nascentes de mRNA resultantes da actividade da RNA polimerase II (revisto em Dreyfuss *et al.*, 2002). Dado que a transcrição viral do HDV ocorre no núcleo e que o envolvimento da RNA polimerase II neste processo tem vindo a ser amplamente sugerido (Filipovska e Konarska, 2000; Gudima *et al.*, 2000), parece plausível que a hnRNPC possa estar envolvida na replicação do HDV. Para testar esta hipótese, uma das abordagens utilizadas consistiu em investigar uma eventual co-localização da hnRNPC com os RNAs e antígenos virais.

A localização subcelular da hnRNPC e HDAGs foi determinada em células Huh7-D12, fazendo uso da técnica de imunofluorescência indirecta e microscopia confocal. As células foram fixadas e em seguidas incubadas com anticorpos anti-HDAg e anti-hnRNPC (figura III.4.5.1). De acordo com os resultados descritos, os HDAGs apresentam uma localização nuclear com uma acumulação preferencial em focos (Cunha *et al.*, 1998). A proteína hnRNPC também apresenta um padrão de distribuição nuclear. A eventual co-localização da hnRNPC com os

HDAGs foi analisada quantitativamente, pelo cálculo do OC. Este coeficiente indica uma estimativa da correlação da intensidade dos sinais verde (HDAg) e vermelho (hnRNPC). O valor médio ($n=10$) de OC obtido para as proteínas hnRNPC e HDAGs foi de $0,823 \pm 0,071$, indicando uma co-localização substancial. Deste modo, este resultado suporta a hipótese das proteínas hnRNPC e HDAg interagirem em células Huh7-D12.

O facto dos antígenos e RNAs do HDV co-localizarem (Cunha *et al.*, 1998), assim como a capacidade de ligação a RNAs, apresentadas pela hnRNPC, sugere que a hnRNPC possa também co-localizar com os RNAs do HDV. Assim, utilizou-se uma combinação da técnica de hibridação *in situ* com imunofluorescência indirecta para analisar a co-localização entre os RNAs de HDV e a proteína hnRNPC. A figura III.4.5.1 apresenta exemplos típicos dos resultados obtidos e o valor do OC também foi calculado (figura III.4.5.1 painel G). Novamente, o valor de OC médio obtido foi elevado ($0,801 \pm 0,066$), sugerindo que os antígenos e RNAs virais podem interagir com a proteína hnRNPC.

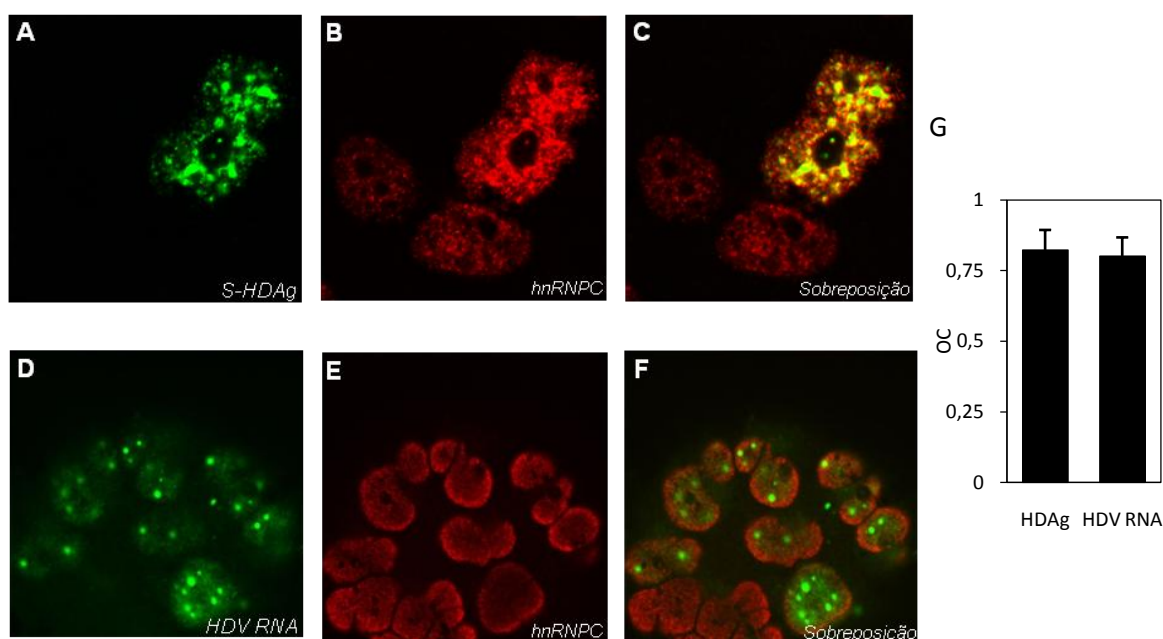


Figura III.4.5.1: Co-localização de hnRNPC com os antígenos e RNA de HDV. (A-C) Células Huh7-D12 foram submetidas a marcação por imunofluorescência dupla indirecta para detecção das proteínas HDAg e hnRNPC. As células foram fixadas com formaldeído a 3.7%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0.5% e marcadas com anticorpos anti-HDAg (A, verde) e anti-hnRNPC (B, vermelho). (D-F) Células Huh7-D12 foram submetidas a hibridação *in situ* seguida de imunofluorescência indirecta para detecção dos RNAs do HDV e da proteína hnRNPC. Após fixação e permeabilização, tal como anteriormente descrito, as células foram hibridadas com uma sonda marcada com digoxigenina para detecção de RNA de HDV (D, verde) e com um anticorpo anti-hnRNPC para detecção da hnRNPC (E, verde). Os painéis C e F apresentam as sobreposições das imagens A e B ou D e E, respectivamente. (H) Analisaram-se 10 imagens de células individuais, de cada ensaio, com a utilização do plug-in JaCoP do programa ImageJ e foram determinados os valores médios do OC.

III.4.6 O SILENCIAMENTO DA hnRNP RESULTA NUMA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS HDAGs

O envolvimento de proteínas da família das hnRNP na replicação de alguns vírus tem vindo a ser descrito por vários autores (Hwang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Neste trabalho, demonstrou-se a interacção das proteínas hnRNP e HDAg *in vivo*, assim como a sua co-localização em células de hepatoma humano. Em seguida, optou-se por analisar o significado funcional da interacção através do silenciamento da hnRNP.

A abordagem seguida para silenciar a hnRNP, baseou-se na utilização do vector pSIREN-RetroQ (Clontech) capaz de expressar shRNAs dirigidos para o mRNA da proteína de interesse. A sequência da hnRNP foi analisada por uma ferramenta informática de modo a identificar sequências-alvo para o silenciamento. Essas sequências foram clonadas no vector pSIREN-RetroQ originando o plasmídeo pSIREN-RetroQ/hnRNP. Em paralelo, foi também construído o plasmídeo pSIREN-RetroQ/Luc capaz de expressar shRNAs dirigidos para o mRNA da proteína luciferase (sequências fornecidas pelo fabricante) e que foi utilizado como controlo negativo nos ensaios.

Os ensaios de silenciamento foram realizados em células Huh7 inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3), de modo a iniciar a replicação do HDV. Após esta primeira transfecção, as células foram novamente transfectadas com o plasmídeo pSIREN-RetroQ/hnRNP e, em seguida, a adição de puomicina permitiu seleccionar as células que integraram os plasmídeos pSIREN-RetroQ. Prepararam-se extractos proteicos que foram analisados por *Western blot* de modo a validar o silenciamento da hnRNP (figura III.4.6.1 A). Para quantificar relativamente a expressão da hnRNP, as intensidades das bandas proteicas foram determinadas, com recurso ao programa ImageJ e a quantidade de proteína aplicada foi normalizada por comparação com a expressão da proteína *housekeeping* clatrina. Tal como mostra o painel B da figura III.4.6.1, a expressão de shRNAs dirigidos para o mRNA de hnRNP reduziu a expressão desta proteína em 55% por comparação com o observado nas células do ensaio utilizado como controlo negativo, transfectadas com o plasmídeo pSIREN-RetroQ/Luc.

Após a confirmação da redução da expressão da hnRNP, pela utilização do vector pSIREN-RetroQ/hnRNP, procedeu-se à análise das eventuais alterações na expressão de HDAg causadas por este silenciamento. Assim, a expressão relativa dos HDAGs foi determinada por análise *Western blot* das amostras de extractos proteicos obtidos no ensaio

de silenciamento de hnRNP C. Os resultados são apresentados na figura III.4.6.1 e mostram que o silenciamento da hnRNP C resulta num decréscimo de 66% e 92% nos níveis de expressão de S-HDAg e L-HDAg, respectivamente. Estes resultados sugerem que a proteína hnRNP C pode desempenhar funções importantes na replicação do HDV.

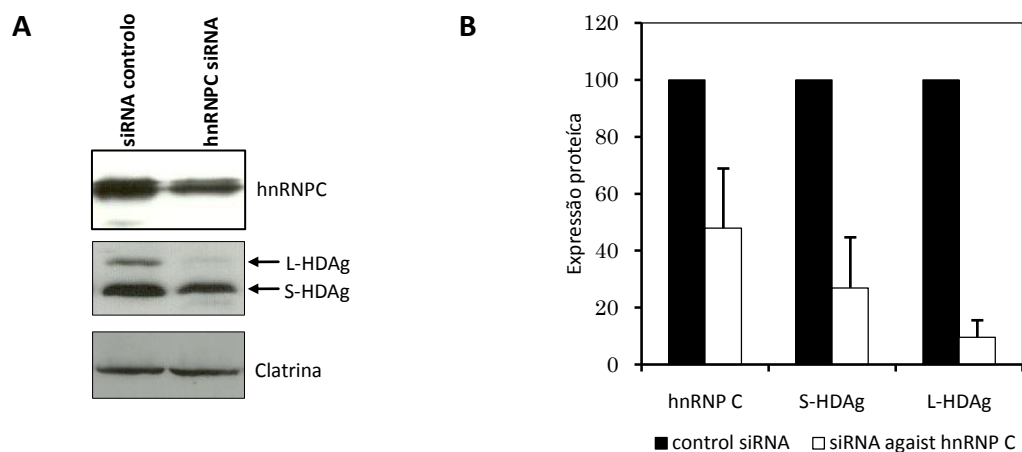


Figura III.4.6.1: O silenciamento da proteína hnRNP C endógena, reduz a expressão de HDAGs em células Huh7-D12. (A) Células Huh7 foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3) e, procedeu-se ao silenciamento da proteína hnRNP C pela utilização de shRNAs em células Huh7. 48 horas após a adição de puomicina, prepararam-se extractos proteicos totais que foram em seguida separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE* e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-hnRNP C (painel superior), anti-HDAgs (painel do meio) ou anti-clatrina (painel inferior), sendo as imagens apresentadas representativas de três ensaios independentes. (B) As imagens foram digitalizadas e determinaram-se as intensidades das bandas, com a utilização do programa ImageJ. Os valores obtidos para as intensidades de bandas da proteína clatrina foram utilizados para normalizar a quantidade de proteína total. A expressão dos HDAgs e hnRNP C é apresentada como percentagem após comparação com os valores obtidos para o controlo negativo que consistiu na utilização de shRNAs específicos para o mRNA da luciferase.

III.5 DISCUSSÃO

No trabalho descrito neste capítulo procedeu-se ao estudo da interacção entre as proteínas S-HDAg e hnRNP, previamente detectada no sistema YTH.

A hnRNP pertence à família das hnRNPs, constituída por proteínas envolvidas em várias etapas da biogénese de mRNA (Dreyfuss *et al.*, 2002). Em células animais, múltiplas cópias da hnRNP e outras proteínas nucleares associam-se a fragmentos de pré-mRNAs e mRNAs, empacotando-os em partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares com velocidade sedimentação de 40S (hnRNP 40S). Estas partículas hnRNP 40S encontram-se envolvidas em vários processos do metabolismo de mRNAs, incluindo *splicing* de pré-mRNA, transporte de mRNA e tradução. Juntamente com a hnRNP, as proteínas hnRNPA e hnRNPB, constituem as proteínas “centrais” das partículas hnRNP 40S, por serem aquelas que se encontram em maior concentração (Dreyfuss *et al.*, 1993). Para além da hnRNP, na pesquisa YTH realizada neste trabalho, também a hnRNPA foi identificada como um interactor da S-HDAg. Ainda que não se tenha explorado a interacção entre a hnRNPA e a S-HDAg, não tendo sido realizada a confirmação da interacção por outros métodos bioquímicos, este resultado pode sugerir uma possível associação da S-HDAg às partículas hnRNP 40S, uma vez que interacciona com diferentes proteínas “centrais”.

As proteínas hnRNP, incluindo a hnRNP, têm sido previamente descritas como implicadas na replicação de vários vírus, nomeadamente, do HCV, poliovirus ou dengue (Gontarek *et al.*, 1999; Bunner *et al.*, 2004; Noisakran *et al.*, 2008). Assim, optou-se por investigar com maior detalhe a interacção entre a hnRNP e a S-HDAg, no sentido de avaliar uma possível função no ciclo de replicação do HDV.

No ensaio YTH, a proteína hnRNP foi identificada em 5 clones independentes. A análise das sequências destes clones revelou a presença sistemática de um codão *stop*, localizado entre a sequência codificante para o AD de GAL4 e a sequência codificante para a ORF da hnRNP. Pelo facto do codão *stop* se encontrar em grelha com as sequências do domínio AD de GAL4 e hnRNP, a ocorrência de um evento de *read-through*, promoveria a expressão da proteína de fusão AD/hnRNP, ainda que apresentando uma sequência adicional, com cerca de 40 aa, a separá-las. Os mecanismos de *read-through* ocorrem com alguma frequência em leveduras e, apesar de inicialmente associados a erros no processo de tradução, actualmente admite-se que desempenham funções regulatórias em vários processos celulares, podendo conferir fenótipos benéficos para as células (revisto em von der Haar e Tuite, 2007). Por esta razão,

procedeu-se à análise de extractos proteicos correspondentes aos clones positivos, por *Western blot* com utilização de um anticorpo específico para a hnRNP, tendo sido possível confirmar a expressão da proteína de fusão AD/hnRNP.

A proteína hnRNP consiste em duas isoformas produzidas por um mecanismo de *splicing* alternativo, a hnRNP1 (298 aa) e a hnRNP2 (302 aa). Estas isoformas diferem apenas numa sequência de 13 aa, localizada na região central, que a hnRNP2 possui adicionalmente. (Burd *et al.*, 1989). Esta particularidade não parece afectar significativamente o comportamento das duas isoformas, que apresentam funções semelhantes. A única diferença funcional entre a hnRNP1 e hnRNP2 parece consistir nas capacidades de ligação a RNA, sendo que a sequência de 13 aa adicionais na hnRNP2, parece tornar a sua ligação a RNA mais específica do que no caso da hnRNP1 (Koloteva-Levine *et al.*, 2002).

Nos 5 clones positivos, a isoforma hnRNP1 foi a identificada. No entanto, num destes clones, uma análise mais detalhada da sequência revelou que era produzida uma forma truncada da hnRNP1. Esta forma truncada consiste numa sequência polipeptídica que compreende os 108 aa N-terminais, sugerindo que a sequência N-terminal da hnRNP1 é suficiente para a ligação à S-HDAg. Este resultado sugere também que a S-HDAg deve, de igual modo, apresentar capacidade de ligação à hnRNP2, uma vez que a sequência dos 106 aa N-terminais é coincidente nas duas isoformas (Burd *et al.*, 1989). Deste modo, a ausência da hnRNP2 entre os clones positivos não deve significar a incapacidade de interagir com a S-HDAg e pode ser explicada pelo facto de se encontrar em menor abundância celular do que a hnRNP1, com níveis de expressão cerca de três vezes inferiores (Koloteva-Levine *et al.*, 2002).

Igualmente, entre as proteínas identificadas no ensaio YTH, encontra-se a proteína Raly. A Raly foi originalmente identificada em murganho (Michaud *et al.*, 1993), tendo sido mais tarde reconhecida uma proteína homóloga em humanos (Vaughan *et al.*, 1996). Esta proteína é estruturalmente muito idêntica à hnRNP, com 306 aa e um único domínio RBD na região N-terminal que apresenta cerca de 70% identidade com o RBD da hnRNP (Rhodes *et al.*, 1997). Além das semelhanças a nível da sequência e estrutura, a Raly possui outras características coincidentes com a hnRNP, nomeadamente, o facto de ser expressa em todos os tecidos e de apresentar um domínio de retenção nuclear que lhe confere uma localização exclusivamente nuclear (Nakielný e Dreyfuss, 1996). Estas evidências sugerem funções semelhantes para as duas proteínas, pelo que a identificação da proteína Raly como

um interactor da S-HDAg no sistema YTH, constitui (mais) um argumento a favor da importância de estudar a participação da hnRNPC no ciclo de replicação do HDV.

Uma primeira abordagem para investigar a interacção S-HDAg/hnRNPC consistiu em testá-la novamente em levedura, tendo-se procedido à co-transformação de células de levedura com os dois plasmídeos codificantes para a DNA-BD/S-HDAg e AD/hnRNPC₁₋₁₀₈. Para além de confirmarem a interacção entre as duas proteínas em levedura, os resultados obtidos nestes ensaios ainda evidenciaram que a região N-terminal da hnRNPC, compreendendo o RBD, é suficiente para a ligação à S-HDAg.

Diferentes regiões da proteína hnRNPC têm sido implicadas na sua ligação a outras proteínas. No caso do proto-oncogene *vav*, a interacção com a hnRNPC ocorre por intermédio de um motivo rico em prolinas localizado entre os aa 125 a 140 da hnRNPC (Romero *et al.*, 1998). Por sua vez, para a ligação com as proteínas de poliovirus, a região C-terminal da hnRNPC revelou-se essencial (Brunner *et al.*, 2004). Neste trabalho, demonstrou-se que os aa 1 a 108 são suficientes para promover a ligação da hnRNPC à S-HDAg. Tanto quanto se sabe, ainda não havia sido reportado o envolvimento desta região da hnRNPC na sua interacção com outras proteínas.

Em seguida, de modo a identificar a região da S-HDAg envolvida na interacção com a hnRNPC, utilizaram-se plasmídeos codificantes para 3 mutantes de deleção da S-HDAg que foram utilizados para co-transformar células de levedura juntamente com o plasmídeo que codifica para a AD/hnRNPC₁₋₁₀₈. Com este procedimento verificou-se que a região C-terminal de S-HDAg, que compreende os aa 98 a 195 e inclui os domínios bipartidos RBD, é responsável pela interacção com a hnRNPC. Assim, o mapeamento da interacção entre S-HDAg e hnRNPC demonstrou que, em ambas as proteínas, as regiões envolvidas na interacção são coincidentes com a localização dos domínios RBD. Este resultado é interessante e, pelo facto dos HDAGs e RNAs virais ocorrerem frequentemente como ribonucleoproteínas (Ryu *et al.*, 1993), sugere que a interacção hnRNPC/S-HDAg pode contribuir para a interacção entre a hnRNPC e os RNAs de HDV.

As evidências obtidas nos resultados dos ensaios YTH, em que a interacção entre a S-HDAg e hnRNPC foi detectada e mapeada, juntamente com as características da hnRNPC descritas até aqui, proporcionaram a continuação do seu estudo. Assim, a interacção S-HDAg/hnRNPC foi analisada recorrendo a outras abordagens bioquímicas. Inicialmente, procedeu-se à análise da interacção, por intermédio de ensaios *blot overlay*. A sequência da hnRNPC foi clonada num vector de expressão procariota, para a produção da proteína correspondente

em *E. coli*, como fusão com um domínio poli-Hist. Foi realizado um ensaio de *blot overlay* com a S-HDAg recombinante purificada e quantidades crescentes de extractos de *E. coli* contendo a proteína His₆/hnRNP. Os resultados obtidos nestes ensaios permitiram confirmar a interacção *in vitro*. Em seguida, recorrendo a ensaios de co-imunoprecipitação, utilizando células Huh7-D12 e anticorpo anti-HDAgs, mostrou-se a existência de complexos hnRNP/S-HDAg em células de hepatoma humano que expressam constitutivamente os componentes do HDV, confirmando a interacção num ambiente *in vivo*.

Sabe-se que os vírus têm capacidade de alterar a organização celular e recrutar componentes na maquinaria enzimática para os locais da replicação e transcrição viral (Ahlquist *et al.*, 2003). Por exemplo, em células HeLa, a infecção pelo vírus da estomatite vesicular resulta na relocação das proteínas hnRNP A1, C1/C2 e K do núcleo para o citoplasma sendo que esta relocação é importante para o ciclo de replicação do vírus (Kneller *et al.*, 2008). O mesmo se verifica nas infecções por rinovirus (Gustin e Sarnow, 2002) e poliovirus (Gustin e Sarnow, 2001), sendo que neste último, a localização citoplasmática da hnRNP C1/C2 permite a sua associação a proteínas virais, facilitando a replicação do vírus (Brunner *et al.*, 2004; Brunner *et al.*, 2010).

No caso específico do HDV, estudos anteriores demonstraram que ambos os antígenos e RNA virais se encontram preferencialmente localizados no núcleo de células infectadas apresentando, na maioria dos casos uma distribuição difusa no nucleoplasma com alguma acumulação adicional em focos (Cunha *et al.*, 1998). De acordo com os autores, estes focos, ainda que constituam locais de acumulação de RNAs e antígenos virais, não representam locais preferenciais da replicação do vírus. No caso da hnRNP se encontrar envolvida na replicação do HDV espera-se que seja possível observar uma co-localização desta proteína com os componentes do HDV no núcleo de células infectadas. Esta hipótese foi testada por ensaios de imunofluorescência e hibridação *in situ* em células Huh7-D12, que expressam constitutivamente os componentes do HDV (Cheng *et al.*, 1993). Após utilização de microscopia confocal, a análise das imagens obtidas permitiu determinar coeficientes de sobreposição de Mander cujos valores obtidos indicaram que mais de 80% da proteína hnRNP endógena co-localiza com ambos os antígenos e RNA do HDV.

Ainda que vários estudos tenham sugerido o envolvimento de proteínas hnRNP como facilitadoras de processos de replicação e tradução de genomas virais (Noisakran *et al.*, 2008; Paek *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2009), outros estudos mostram que algumas hnRNPs

regulam negativamente a replicação viral, constituindo exemplos o HIV-1 (Bolinger e Boris-Lawrie, 2009; Jablonski e Caputi, 2009) e o vírus influenza A (Lee *et al.*, 2010).

Com o propósito de esclarecer se a hnRNP afecta de algum modo a replicação do HDV, utilizaram-se siRNAs específicos para a hnRNP e avaliou-se o efeito do seu silenciamento na replicação do HDV. Os resultados demonstraram que o silenciamento da hnRNP resulta numa diminuição acentuada da expressão dos dois HDAs, sugerindo que a hnRNP é necessária para a replicação do HDV. De que modo a interacção S-HDAg/hnRNP, demonstrada neste trabalho, determina o envolvimento da hnRNP na replicação do HDV necessita de ser investigado com maior detalhe.

A participação da hnRNP na replicação do poliovirus é uma das mais bem estudadas (Brunner *et al.*, 2004; Brunner *et al.*, 2010). Após Brunner e colaboradores terem demonstrado a capacidade da hnRNP se ligar a RNAs de poliovirus de ambas polaridades, estes autores também obtiveram resultados indicativos de que a ausência de ligação entre a hnRNP e proteínas virais se reflecte numa diminuição na síntese de RNA viral. Aparentemente, a interacção destas proteínas virais com a hnRNP é indispensável para a síntese de RNA viral, pois estabiliza a ligação da hnRNP ao RNA, permitindo a sua participação no complexo de síntese de RNA do poliovirus (Brunner *et al.*, 2004).

Ainda que o poliovirus apresente características distintas do HDV, sendo um vírus de polaridade positiva cuja replicação ocorre maioritariamente no citoplasma, um mecanismo semelhante pode ser proposto para o HDV. Uma hipótese possível é que a interacção entre a hnRNP e a S-HDAg facilita uma eventual ligação de RNA viral à hnRNP. Note-se que, apesar de inicialmente se admitir que a hnRNP se liga especificamente a zonas localizadas na região 3' UTR de mRNAs (Hsieh *et al.*, 1990), vários estudos têm demonstrado a sua capacidade de ligar a várias sequências de RNA, localizadas tanto em regiões 3'UTR como em 5' UTR e até mesmo no interior de ORFs (Christian *et al.*, 2008). Também foi sugerido que a ligação depende principalmente do contexto e estrutura do RNA (Koloteva-Levine *et al.*, 2002). Assim, parece plausível admitir uma ligação entre a hnRNP e os RNAs genómico e antigenómico do HDV. No entanto, futuramente será fundamental investigar a capacidade de ligação de RNA de HDV à hnRNP, avaliando também a sua dependência da S-HDAg.

Recentemente, Brunner e colaboradores aprofundaram o estudo da interacção da hnRNP com os componentes do poliovirus e propuseram um modelo que procura explicar o seu envolvimento na replicação viral. De acordo com este modelo, a hnRNP faz parte do complexo de iniciação da síntese de RNA viral, actuando como uma chaperona que facilita a

adquirição da conformação necessária para o início da síntese de RNA (Brunner *et al.*, 2010). No que respeita ao HDV, é consensual a participação da S-HDAg durante a síntese de RNA (Kuo *et al.*, 1989; Lazinski e Taylor, 1993). Com base no modelo proposto por Brunner *et al.* (2010) pode-se então sugerir o recrutamento da hnRNP pelo complexo de iniciação da transcrição do HDV, por intermédio da S-HDAg. Consequentemente, será interessante investigar esta hipótese, analisando uma possível função de chaperona da hnRNP no seio deste complexo.

Resumindo, no trabalho descrito neste capítulo foi confirmada a interacção entre a proteína S-HDAg e a hnRNP, tendo sido demonstrado que as duas proteínas se localizam preferencialmente no núcleo de células infectadas. Tendo por base algumas evidências provenientes de estudos de envolvimento da hnRNP noutros ciclos de replicação virais, foi possível especular possíveis explicações para a importância da interacção S-HDAg/hnRNP no ciclo de replicação do HDV. No futuro, será interessante analisar a viabilidade destas hipóteses assim como determinar se a interacção S-HDAg/hnRNP influencia algumas das funções associadas à hnRNP que incluem, por exemplo, a formação de partículas hnRNPs estáveis ou a regulação do ciclo celular e apoptose. Estes estudos podem contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos na interacção assim como fornecer dados que permitam clarificar a replicação e patogénese do HDV.

CAPÍTULO IV

Caracterização da interacção HuR/S-HDAg

IV.1 INTRODUÇÃO

IV.1.1 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS HU/ELAVL

As proteínas humanas Hu constituem uma família clássica de RBPs que ocorrem como antígenos específicos de síndromas neurológicos paraneoplásicos (Graus *et al.*, 1994; Manley *et al.*, 1995; Verschuuren *et al.*, 1997). Pelo facto de partilharem homologias com a família de proteínas ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) de *D.* são também designadas por ELAVL (semelhantes a *embryonic lethal abnormal vision*).

Em *D. melanogaster*, as proteínas ELAVL são expressas logo após a diferenciação neuronal (Robinow e White, 1991), sendo fundamentais para a viabilidade e o correcto desenvolvimento do sistema nervoso (Campos *et al.*, 1985). Em humanos, três dos quatro membros da família, Hel-N1/HuB, HuC e HuD, são específicos de neurónios e encontram-se igualmente implicados no desenvolvimento neuronal (Deschênes-Furry *et al.*, 2006; Pascale *et al.*, 2008). Por sua vez, o quarto membro, a proteína HuR, também conhecida como ELAVL1, apresenta expressão ubíqua (Keene, 1999; Brennan e Steitz, 2001), verificando-se ainda a sua sobre-expressão numa grande variedade de tumores (López de Silanes *et al.*, 2005).

Todos os membros da família Hu contêm RBDs através dos quais se ligam especificamente a sequências ricas em Us e AUs (AREs), em regiões não traduzidas de transcritos de mRNA (Levine *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1993; López de Silanes *et al.*, 2004). Aparentemente, todas as funções biológicas associadas às proteínas Hu resultam da capacidade de ligação a sequências AREs de mRNAs alvo, que previnem a sua degradação aumentando indirectamente a expressão proteica (revisto em Hinman e Lou, 2008).

IV.1.2 ELAVL1/HuR

O facto da HuR se encontrar expressa em todos os tecidos, contrariamente aos membros neuronais da família ELAVL, sugere que esta proteína possui funções mais abrangentes. Também por esta razão, a HuR tem sido a proteína mais estudada da família Hu, prevendo-se, no entanto, que muitos dos mecanismos moleculares associados à HuR sejam coincidentes com os dos restantes membros.

A análise da sua sequência, assim como dos outros membros da família Hu, revelou que se tratam de RBPs clássicas. Todos os membros da família possuem três RBDs que compartilham cerca de 90% de identidade entre as suas sequências de aa (Okano e Darnell,

1997). Estudos de ressonância magnética mostraram que os RBD1 e 2 cooperam na ligação a sequências ARES (Inoue *et al.*, 2000), enquanto o RBD3 aparentemente auxilia na estabilização dos complexos RNA-proteína.

Para além dos três RBD, as proteínas Hu contêm uma região básica menos conservada localizada entre os RBD1 e 2 e a extremidade N-terminal. No caso da HuR, esta região compreende uma sequência de transporte nucleocitoplasmático (HNS), que inclui um NLS e um NES (Fan e Steitz, 1998). Por esta razão, ainda que a HuR possua localização predominantemente nuclear, a presença do domínio HNS, permite que se movimente entre o núcleo e o citoplasma (Fan e Steitz, 1998).



Figura IV.1.2.1: Representação esquemática dos domínios funcionais identificados em HuR. A proteína contém três domínios de ligação a RNA (RBD) e um sinal de tráfego nucleocitoplasmático (HNS).

A principal função associada à HuR é a estabilização de mRNAs contendo sequências ARES (revisto em Brennan e Steitz, 2001). Actualmente conhecem-se muitos mRNAs alvo de estabilização pela HuR. Por exemplo, admite-se que a HuR medeia a resposta celular a danos no DNA e outros tipos de stress, por intermédio de regulação pós-transcricional de genes envolvidos no controlo do crescimento celular e proliferação (Gorospe, 2003). Por outro lado, também tem sido associada a um aumento de expressão de proteínas que contribuem para a oncogénese (López de Silanes *et al.*, 2005) assim como de proteínas envolvidas na apoptose (Lal *et al.*, 2005; Mazroui *et al.*, 2008). Vários estudos sugerem ainda que a HuR pode ser importante em diversas funções que incluem a diferenciação muscular, supressão da resposta inflamatória ou adipogénese (Figuerola *et al.*, 2003; Katsanou *et al.*, 2005; Cherry *et al.*, 2006).

Ainda que seja mais reconhecida pela sua capacidade de estabilizar mRNAs, a HuR também pode regular a expressão proteica ao nível da tradução. Um dos mecanismos pelos quais a HuR é capaz de regular a síntese proteica consiste na sua ligação a elementos IRES. Alguns exemplos da participação da HuR na iniciação da tradução, ao funcionar como um elemento regulatório de IRES, incluem a tradução das proteínas celulares p27 e factor 1 α indutor de hipoxia (HIF-1 α), (Kullmann *et al.*, 2002; Galbán *et al.*, 2008) assim como proteínas virais do HIV-1 e HCV (Rivas-Aravena *et al.*, 2009).

Pelo facto de se encontrar envolvida numa grande variedade de eventos de regulação pós-transcricional, a HuR tem sido associada a uma lista crescente de funções biológicas. Não é portanto surpreendente que esta proteína tenha vindo a ser implicada em várias patologias humanas comuns, tais como inflamações crónicas, doenças cardiovasculares, cancro e infecções virais (revisto em Eberhardt *et al.*, 2007).

IV.2 OBJECTIVOS

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo:

- Investigar a interacção entre a S-HDAg e a HuR, previamente identificada pelo sistema YTH.

IV.3 MATERIAIS E MÉTODOS

IV.3.1 SISTEMA YTH

IV.3.1.1 SEQUENCIAÇÃO DE DNA

As reacções de sequenciação para determinar a identidade dos fragmentos de cDNA inseridos em vectores pGADT7-Rec foram de acordo com o previamente descrito em III.3.1.1.

IV.3.1.2 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LEVEDURA

A preparação de extractos proteicos de clones positivos foi efectuada seguindo o protocolo descrito em II.3.1.6.1 (método ureia/SDS). Para detectar as proteínas pretendidas, os extractos foram submetidos a análise por *Western blot* com utilização do anticorpo monoclonal anti-HuR de murganho (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:3000 em PBS contendo 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

IV.3.1.3 (Co)TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

A introdução de DNA plasmídico em células de levedura foi efectuada segundo o método de LiAc, de acordo com o previamente descrito em III.3.1.4.

IV.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

IV.3.2.1 VECTORES

Os plasmídeos pET28c e pGEX-6P-2, previamente descritos em III.3.2.1, foram utilizados para a expressão de proteínas de fusão com poli-Hist ou GST, respectivamente, de acordo com os procedimentos indicados em III.3.2.

IV.3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO RECOMBINANTES

Procedeu-se à construção do plasmídeo pET28c/HuR para permitir a expressão da proteína HuR, como fusão com seis resíduos de histidina consecutivos (His₆/HuR).

O cDNA correspondente à ORF da HuR foi obtido por PCR, tendo sido utilizado como molde o cDNA de HuR clonado no plasmídeo pCMV_SPORT6 (IMAGE clone #2901220; Geneservice Ltd, UK). Os *primers forward* 5'TTATCAATTGCCATGTCTAATGGTTATGAAGACCACATGG3' e

reverse 5'TTATGTCGACCGAGTTATTTGTGGGACTTGTTGG3' foram utilizados. As reacções de PCR, hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação foram realizadas de acordo com o previamente descrito em II.3.1.3.

IV.3.2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

A produção de proteínas de fusão GST/S-HDAg e His₆/HuR seguiu o procedimento descrito em III.3.2.3. A confirmação da expressão das proteínas pretendidas foi realizada por *Western blot*, tal como descrito em III.3.2.3.

IV.3.2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína S-HDAg foi realizada por cromatografia de afinidade, tendo sido utilizadas colunas comerciais GSTrap (GE Healthcare), de acordo com o procedimento descrito em III.3.2.4.

IV.3.3 BLOT OVERLAY

O procedimento adoptado nos ensaios de *blot overlay* coincidiu com o descrito em III.3.3, tendo sido utilizados extractos proteicos obtidos de *E. coli*, contendo a proteína His₆/HuR.

IV.3.4 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Foram utilizadas as linhas celulares Huh7 e Huh7-D12, cultivadas e manipuladas de acordo com o descrito em III.3.4.

IV.3.5 TRANSFECCÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Nos procedimentos de transfecção, utilizou-se uma mistura comercial de lípidos catiónicos (FuGENE® 6 Transfection Reagent; Roche), de acordo com o descrito em III.3.5.

IV.3.6 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Os extractos proteicos de células Huh7 ou Huh7-D12 foram preparados seguindo o procedimento descrito em III.3.6.

IV.3.7 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Nos ensaios de co-imunoprecipitação, extractos de células Huh7-D12 foram incubados com anticorpo policlonal anti-HDAgs B3 e utilizaram-se partículas magnéticas covalentemente

ligadas a proteína G (Dynabeads Protein G; Invitrogen) para capturar os imunoprecipitados, de acordo com o descrito em III.3.7.

A análise por *Western blot* para detecção da proteína HuR nos imunoprecipitados foi efectuada com a utilização de anticorpo monoclonal de murganho anti-HuR, na concentração final de 1:3000, (Santa Cruz Biotechnologies), tal como descrito em II.3.1.6.3.

IV.3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

A distribuição intracelular de proteínas foi analisada por imunofluorescência indirecta, de acordo com o descrito em III.3.8, tendo sido utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-HDAg B3 e o anticorpo monoclonal de murganho anti-HuR, ambos diluídos 1:100.

IV.3.9 HIBRIDAÇÃO *in situ*

IV.3.9.1 MARCAÇÃO DE SONDA POR *NICK-TRANSLATION*

O plasmídeo pSVL(D3) foi utilizado na síntese de sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche), por *nick-translation*, tal como previamente descrito em III.3.9.1.

IV.3.9.2 HIBRIDAÇÃO *in situ*

Os ensaios de hibridação *in situ*, seguiram o procedimento descrito em III.3.9.2. Para detecção da proteína HuR foi utilizado o anticorpo monoclonal de murganho anti-HuR (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:100.

IV.3.10 MICROSCOPIA CONFOCAL

As amostras biológicas marcadas com fluorocromos foram analisadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss). O processamento de dados e análise quantitativa de co-localizações foram realizados no programa ImageJ (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>), utilizando o plug-in JaCoP (Bolte e Cordelières, 2006), tal como descrito em III.3.10.

IV.3.11 SISTEMA PARA INDUÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA

IV.3.11.1 ESCOLHA DAS SEQUÊNCIAS ALVO

As sequências alvo a utilizar na construção do vector para a expressão de shRNA dirigidos para o mRNA de HuR, foram seleccionadas com recurso a uma ferramenta informática

(<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do>), tal como descrito anteriormente (III.3.11.1), e foram as seguintes:

5'gatccGAGGCAATTACCAGTTTCATTCAAGAGATGAAACTGGTAATTGCCTCTTTTTTACGCGTg3' e 5'aattcACGCGTAAAAAGAGGCAATTACCAGTTTCATCTCTTGAATGAAACTGGTAATTGCCTCg3'.

Os nucleótidos sublinhados denotam a sequência do shRNA alvo (nucleótidos no mRNA da HuR).

IV.3.11.2 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pSIREN-RETROQ/HuR

Procedeu-se à construção do plasmídeo pSIREN-RetroQ/HuR, tendo-se utilizado os oligonucleótidos descritos em IV.3.11.1.

O emparelhamento dos oligonucleótidos, assim como as reacções de hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação foram realizados de acordo com o previamente descrito em III.3.11.2.

IV.3.11.3 SILENCIAMENTO DA PROTEÍNA HuR EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Na realização de ensaios de silenciamento da proteína HuR as células Huh7 foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3), e em seguida com o vector pSIREN-RetroQ/HuR, tal como descrito em III.3.11.3.

Os extractos proteicos obtidos foram separados em géis de 12% poliacrilamida por SDS-PAGE seguidos de *Western blot* para detecção da HuR e HDAGs, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3, respectivamente. Na detecção dos HDAGs foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho anti-HDAg B3 e na detecção da proteína HuR utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-HuR de murganho (Santa Cruz Biotechnologies), na concentração final de 1:5000 ou 1:3000, respectivamente.

IV.4 RESULTADOS

IV.4.1 A PROTEÍNA HuR INTERACTUA COM A S-HDAg NO SISTEMA YTH

A pesquisa YTH descrita no capítulo II, permitiu identificar a proteína HuR, como um interactor da S-HDAg. Após a re-sequenciação da sequência de cDNA contida no plasmídeo isolado deste clone positivo, verificou-se que correspondia a um fragmento de cDNA codificante para cerca de 96% da ORF da HuR.

A proteína HuR, também conhecida como ELAVL1 por ser membro da família de proteínas ELAVL, é uma proteína com 326 aa que tem sido descrita como uma RBP, compreendendo três RBDs. A sequência identificada na pesquisa YTH compreende os aa 12 a 326 da HuR (figura IV.4.1.1) e compreende os três RBDs.

A proteína de fusão produzida no sistema YTH foi designada de AD/HuR₁₂₋₃₂₆ e, de modo a confirmar a sua presença no respectivo clone positivo, recorreu-se a análise por *Western blot*. Assim, prepararam-se amostras de extractos proteicos de levedura contendo o clone positivo, assim como de células AH109 não transformadas, que foram utilizadas como controlo negativo. Após separação por *SDS-PAGE* e transferência para membranas de nitrocelulose, a utilização de um anticorpo específico que reconhece a HuR permitiu identificar duas bandas nas amostras correspondentes ao clone positivo (figura IV.4.1.1). A banda de massa molecular superior, cerca de 55KDa, é compatível com a dimensão esperada para a AD/HuR₁₂₋₃₂₆ enquanto a banda de massa molecular inferior poderá corresponder a uma forma truncada da proteína.

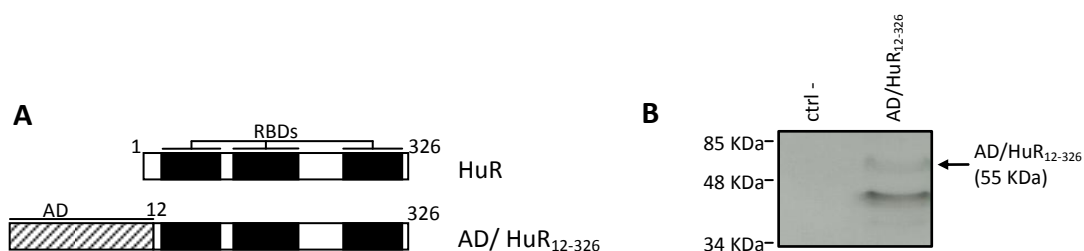


Figura IV.4.1.1: Identificação da proteína HuR como interactor da S-HDAg no sistema YTH (A) Representação esquemática da proteína HuR e da proteína de fusão com o AD de GAL4 identificada num clone positivo da pesquisa YTH (AD/HuR₁₂₋₃₂₆). A proteína AD/ HuR₁₂₋₃₂₆ apresenta uma forma truncada da HuR, que não inclui os 12 primeiros aa da extremidade N-terminal. RBDs representam os motivos de ligação a RNA presentes em HuR **(B)** Análise por *Western blot* para detecção da presença de AD/HuR no clone positivo. Extractos proteicos totais do clone positivo foram preparados, separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE* e a detecção da proteína de interesse foi efectuada com um anticorpo monoclonal anti-HuR. Extractos totais de levedura AH109 não transformada foram utilizados como controlo negativo (ctrl-).

A HuR foi previamente implicada em processos de regulação pós-transcricional (Brennan *et al.*, 2000) e também tem sido descrita como envolvida na replicação de vários vírus, incluindo o HCV, Herpesvirus saimiri (HVS) e HIV-1 (Spångberg *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2004; Lemay *et al.*, 2008). Assim, parece plausível que esta proteína também esteja envolvida na replicação do HDV.

Para investigar esta hipótese, inicialmente procedeu-se à confirmação dos resultados obtidos na pesquisa YTH. Células de levedura AH109 foram co-transformadas com o plasmídeo isco (pAS2-1/S-HDAg) e com o plasmídeo isolado da biblioteca (pGADT7-Rec/HuR₁₂₋₃₂₆) e a interacção entre as duas proteínas foi testada pela activação de três genes repórteres (*ADE2*, *HIS3* e *MEL1*). Como controlo negativo foram utilizadas células de levedura AH109 transformadas individualmente com pAS21/S-HDAg ou pGADT7-Rec/HuR₁₂₋₃₂₆. Contrastando com os controlos negativos, as células de levedura que expressam ambas as proteínas de fusão DNA-BD/S-HDAg e AD/HuR₁₂₋₃₂₆ cresceram em meio mínimo sem os aa triptofano, leucina, histidina e adenina (SD/-Leu/-Trp/-Hist/-Ade) e mostraram a actividade da α -galactosidase, pelo desenvolvimento da cor azul (figura IV.4.1.2). Estes resultados permitiram confirmar a interacção entre a S-HDAg e HuR no sistema YTH.

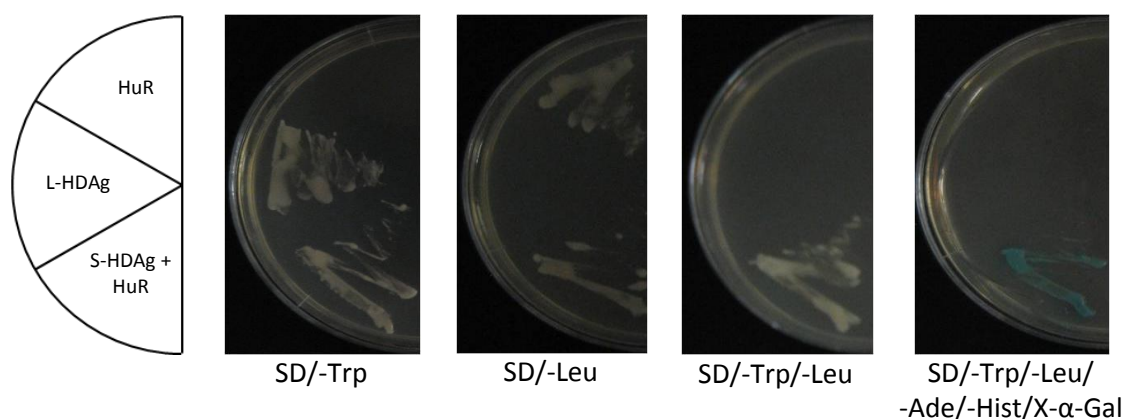


Figura IV.4.1.2: Confirmação da interacção S-HDAg no sistema YTH. Células de levedura AH109 foram (co)transformadas com plasmídeos que permitem a expressão das proteínas indicadas e as interacções foram testadas pela selecção de crescimento em meios sem os aa leucina e/ou triptofano (SD/-Leu, SD/-Trp e SD/-Trp/-Leu) para seleccionar as construções em pGADT7-Rec e/ou pAS2-1. A activação dos genes repórteres foi testada em meio de crescimento sem triptofano, leucina, adenina e histidina e contendo X- α -Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-Hist/X- α -Gal).

IV.4.2 A PROTEÍNA HuR INTERAGE COM A S-HDAg *in vitro* E *in vivo*

Tendo-se estabelecido que a S-HDAg e a HuR interagem no sistema YTH, avaliou-se a ocorrência da mesma interacção recorrendo a outros sistemas experimentais e abordagens bioquímicas.

Inicialmente a interacção foi testada *in vitro* procedendo-se a um ensaio de *blot overlay*. À semelhança do descrito no capítulo anterior, em III.4.3.1, o vector pGEX-6P-2/S-HDAg foi utilizado para produzir a proteína de fusão GST/S-HDAg que foi, em seguida, purificada. Para isso foram utilizadas colunas comerciais de sefarose conjugada com glutationa e o domínio GST foi clivado com a protease PreScission para obter a proteína S-HDAg, tal como previamente descrito (figura III.4.3.1). A expressão da His₆/HuR foi induzida pela adição de IPTG em células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28c/HuR. A análise da expressão foi efectuada recorrendo a *Western blot*, utilizando um anticorpo que reconhece especificamente o domínio poli-Hist. Na figura IV.4.2.1 é possível verificar que os extractos proteicos de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28c/HuR apresentam um produto único com a dimensão esperada (41 KDa).

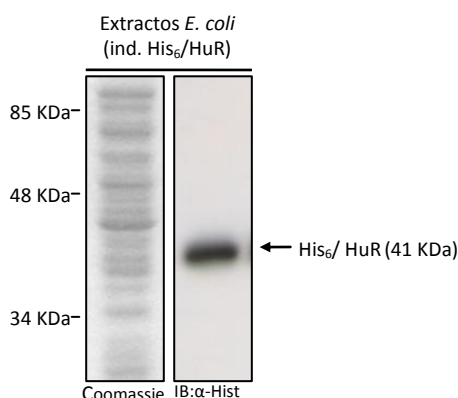


Figura IV.4.2.1: Análise por SDS-PAGE e Western blot da proteína recombinante His₆/HuR. Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP foram transformadas com o plasmídeo pET28c/HuR e a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas totais nos extractos foram separadas em géis de 12% poliacrilamida por SDS-PAGE. O painel da esquerda corresponde aos extractos totais de *E. coli* separados por electroforese e corados com azul brilhante de Coomassie. O painel da direita corresponde aos mesmos extractos, transferidos para membranas de nitrocelulose, com a detecção da proteína His₆/HuR pelo anticorpo anti-Hist.

Nos ensaios de *blot overlay*, quantidades crescentes de amostras proteicas contendo a proteína His₆/HuR foram aplicadas em géis de 12% poliacrilamida. Após a separação das proteínas por SDS-PAGE estas foram transferidas para membranas de nitrocelulose que foram subsequentemente incubadas com 40µg de S-HDAg recombinante. A detecção da

S-HDAg que se ligou foi realizada utilizando um anticorpo policlonal específico que reconhece o HDAg. Os resultados obtidos encontram-se na figura IV.4.2.2 e mostram que quantidades crescentes da proteína His₆/HuR (painel do meio da figura IV.4.2.2 A) resultam num aumento proporcional da quantidade de S-HDAg ligada (figura IV.4.2.2 A), o que sugere a especificidade da interacção entre as duas proteínas.

A interacção *in vivo* entre a S-HDAg e a HuR foi investigada por ensaios de co-imunoprecipitação em células Huh7-D12. Uma vez que a HuR é uma proteína de expressão ubíqua (Ma *et al.*, 1996) e que as células Huh7-D12 expressam todos os componentes do HDV, uma eventual interacção entre as proteínas HuR e S-HDAg deverá ser detectada nestas células. Prepararam-se extractos proteicos de células Huh7-D12 que foram incubados com o anticorpo policlonal anti-HDAg. Amostras das proteínas imunoprecipitadas foram separadas por *SDS-PAGE*, transferidas para membranas de nitrocelulose e detectadas por *Western blot* com a utilização do anticorpo anti-HuR. Em paralelo, realizou-se um controlo negativo, tendo-se procedido de modo semelhante, mas sem adição de anticorpo anti-HDAg aos extractos proteicos. Na figura IV.4.2.2 B é possível observar que a HuR e S-HDAg podem ser co-imunoprecipitadas em células Huh7-D12, o mesmo não se verificando no controlo negativo, sugerindo que estas proteínas interagem em células humanas que expressam o HDV.

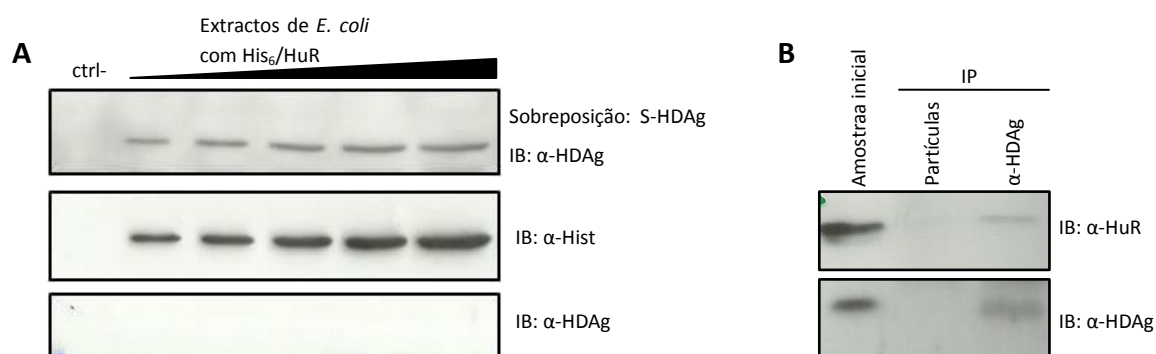


Figura IV.4.2.2: Interacção *in vitro* e *in vivo* de HuR e S-HDAg. (A) Ensaio de *blot overlay*. Extractos proteicos de *E. coli* foram preparados após indução de expressão de proteínas recombinantes. Quantidades crescentes de extractos contendo His₆-HuR foram separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com a proteína S-HDAg recombinante purificada. Para a detecção de S-HDAg foi utilizado o anticorpo policlonal anti-HDAgs B3 (painel superior). Como controlo negativo (ctrl-) foram utilizados extractos de *E. coli* sem His₆/HuR. No painel do meio apresenta-se o resultado da análise por *Western blot* dos mesmos extractos com utilização de anticorpo anti-Hist, confirmando a presença de His₆/HuR nas amostras. No painel inferior apresenta-se, como controlo negativo, o resultado da análise por *Western blot* com utilização do anticorpo anti-HDAg, comprovando que o anticorpo anti-HDAg não reconhece directamente a His₆/HuR. (B) Co-imunoprecipitação de HuR com HDAgs. Lisados celulares de células Huh7-D12 foram imunoprecipitados com anticorpo anti-HDAgs e separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*. Após transferência para membranas de nitrocelulose, procedeu-se à detecção com um anticorpo anti-HuR. O controlo negativo foi realizado na ausência de anticorpo anti-HDAg na fase de imunoprecipitação.

IV.4.3 A PROTEÍNA HuR CO-LOCALIZA COM OS ANTIGÉNIOS E RNAs DO HDV EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Uma vez que a S-HDAg e a HuR interagem *in vitro* e *in vivo*, e pelo facto desta proteína se encontrar envolvida em modificações pós-transcripcionais de RNAs e modulação da replicação de HCV e HIV-1 (Spångberg *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2008), parece possível que a HuR se encontre envolvida no controlo de algumas etapas do ciclo de replicação do HDV.

É actualmente bem estabelecido que os vírus podem subverter o metabolismo celular nomeadamente pelo recrutamento de factores celulares do hospedeiro para os locais da replicação.

Para avaliar a interacção entre a S-HDAg e a HuR no contexto celular, a distribuição das duas proteínas foi determinada por imunofluorescência indirecta com marcação dupla e microscopia confocal. A distribuição da S-HDAg foi consistente com os resultados previamente descritos (Cunha *et al.*, 1998), demonstrando uma localização nuclear, com acumulação preferencial em focos nucleares (figura IV.4.3.1 A). A proteína HuR também revelou um padrão de localização essencialmente nuclear (figura IV.4.3.1 B), aparentemente sobrepondo-se com os HDAGs (figura IV.4.3.1 C). O grau da co-localização das duas proteínas foi quantificado pela determinação do OC. O valor de OC médio (n=10) determinado para a HDAg e a HuR foi de $0.772 \pm 0,113$ o que indica que as duas proteínas co-localizam significativamente. Os resultados obtidos são consistentes com a hipótese de que a HuR e a HDAg interagem em células Huh7-D12.

Estudos anteriores revelaram que as HDAGs e os RNAs de HDV co-localizam e interagem no núcleo de células de fígado (Cunha *et al.*, 1998). Uma vez que a HuR é uma proteína de ligação a RNA, investigou-se se o padrão de distribuição da proteína se relaciona também com o dos RNAs virais. Neste sentido, combinaram-se as técnicas de imunofluorescência e de hibridação *in situ* para analisar a co-localização entre os RNAs de HDV e a proteína HuR. Uma sonda marcada com digoxigenina foi utilizada para hibridar os RNAs de HDV e a proteína HuR foi detectada por imunofluorescência indirecta, tal como descrito anteriormente. Na figura IV.4.3.1 apresentam-se exemplos típicos dos resultados obtidos. O valor de OC médio obtido ($0,762 \pm 0,074$, n=10) é semelhante ao obtido para a co-localização de HuR/HDAg o que pode sugerir que a proteína HuR interage também com os RNAs virais.

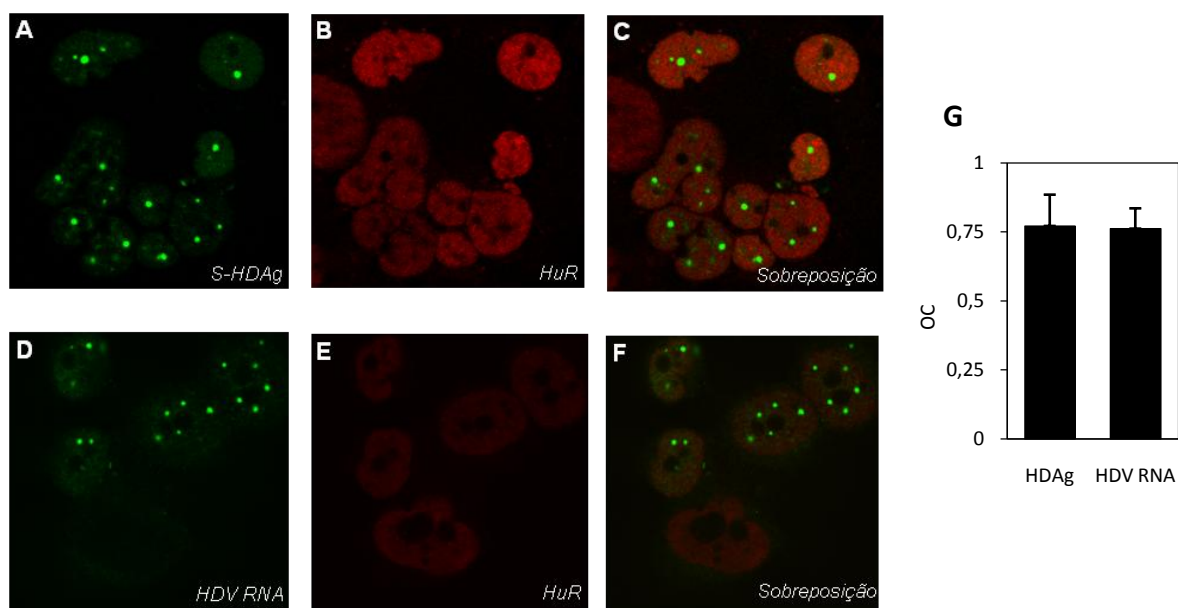


Figura IV.4.3.1: Co-localização de HuR com os antígenos e RNA de HDV. (A-C) Células Huh7-D12 foram submetidas a marcação por imunofluorescência dupla indirecta para detecção das proteínas HDAg e HuR. As células foram fixadas com formaldeído a 3.7%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0.5% e marcadas com anticorpos anti-HDAg (A, marcação a verde) e anti-HuR (B, marcação a vermelho). (D-F) Células Huh7-D12 foram submetidas a hibridação *in situ* seguida de imunofluorescência indirecta para detecção dos RNAs do HDV e da proteína HuR. Após fixação e permeabilização, tal como anteriormente descrito, as células foram hibridadas com uma sonda marcada com digoxigenina para detecção de RNA de HDV (D, marcação a verde) e com um anticorpo anti-HuR (E, marcação a verde). Os painéis C e F apresentam as sobreposições das imagens A e B ou D e E, respectivamente. (H) Analisaram-se 10 imagens de células individuais, em cada ensaio, com a utilização do plug-in JaCoP do programa ImageJ e foram determinados os valores médios do OC.

IV.4.4 A PROTEÍNA HU R ENCONTRA-SE SOBRE-EXPRESSA EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO QUE EXPRESSAM OS COMPONENTES DO HDV

Foi recentemente reportado que em células de hepatoma humano, a síntese dos RNAs e HDAGs é acompanhada da alteração nos níveis de expressão de diversas proteínas celulares (Mota *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2009).

Na tentativa de investigar se a síntese de RNPs de HDV também induz alterações nos níveis de expressão da HuR, procedeu-se à comparação das quantidades relativas da proteína em células Huh7 e Huh7-D12. Extractos proteicos de ambas as linhas celulares foram preparados, separados por *SDS-PAGE* e analisados por *Western blot* utilizando um anticorpo específico para a HuR. Um anticorpo específico anti-clatrina foi utilizado como controlo interno nestes ensaios para normalizar a quantidade de proteína total. As imagens das membranas obtidas foram digitalizadas e as intensidades das bandas foram determinadas por densitometria, com recurso ao programa ImageJ. Os resultados obtidos mostram que os níveis de expressão da HuR se encontram aumentados 1.7 vezes em células Huh7-D12

quando comparados com células Huh7 (figura IV.4.4.1). Considerando que apenas 10-15% de células Huh7-D12 expressam RNPs de HDV num determinado momento (Mota *et al.*, 2009), este resultado parece reforçar um possível envolvimento da proteína HuR no ciclo de replicação do vírus.

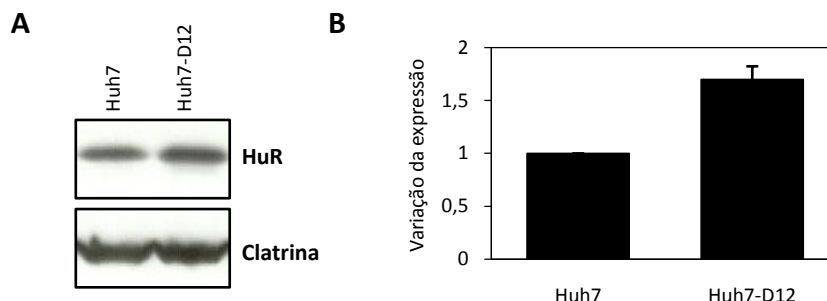


Figura IV.4.4.1: Sobre-expressão da HuR em células Huh7-D12 (A) Análise por *Western blot* da proteína HuR em células Huh7 e Huh7-D12. Extractos proteicos totais foram separados em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-HuR e anti-clatrina. As imagens são representativas de três ensaios independentes. (B) As membranas foram digitalizadas e as intensidades das bandas foram determinadas com recurso ao programa ImageJ. Os níveis de expressão relativa foram obtidos após normalização com a clatrina.

IV.4.5 O SILENCIAMENTO DA HuR RESULTA NUMA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS HDAGs

A proteína HuR foi previamente implicada em processos de estabilização de mRNA e controlo da tradução (revisto em Brennan e Steitz, 2001). Tendo sido obtidas várias evidências que sugerem a interacção entre a HuR e a S-HDAg e que a HuR se encontra sobre-expressa durante a síntese de HDV RNPs, decidiu-se avaliar o efeito do seu silenciamento na síntese de HDAGs.

Recorreu-se a uma tecnologia para silenciamento da HuR baseada em shRNAs expressos a partir de um vector de expressão eucariota (pSIREN-RetroQ). Foi construído um plasmídeo que codifica shRNAs específicos para o mRNA que codifica a proteína HuR (pSIREN-RetroQ/HuR). Células Huh7 foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3) de modo a iniciar a síntese dos componentes do HDV e, 48 horas mais tarde, transfectadas com o plasmídeo pSIREN-RetroQ/HuR. Em seguida foi adicionada puomicina para seleccionar as células transfectadas com vectores pSIREN-RetroQ e preparam-se extractos proteicos destas células. Como controlo negativo, realizaram-se transfecções paralelas com o plasmídeo pSIREN-RetroQ/Luc que produz shRNAs direccionados para mRNAs da luciferase.

A eficiência da redução nos níveis celulares de HuR, causada pelos shRNAs codificados pelo plasmídeo pSIREN-RetroQ/HuR, foi monitorizada por *Western blot*. Tal como se verifica na

figura IV.4.5.1, a expressão de shRNAs complementares ao mRNA da HuR, reduziu a expressão da HuR em cerca de 55% em comparação com a expressão de shRNAs complementares ao mRNA da luciferase.

O efeito do silenciamento da HuR na síntese dos HDAGs também foi analisado por *Western blot* utilizando amostras proteicas obtidas nos mesmos ensaios de silenciamento. Os resultados, apresentados na figura IV.4.5.1, mostram que o silenciamento da HuR resulta numa diminuição de 55% ou 93% nos níveis de expressão da S-HDAg ou L-HDAg, respectivamente. Estes resultados indicam que a expressão de HDAGs é inibida quando ocorre o silenciamento da HuR em células Huh7, sugerindo que esta proteína pode desempenhar funções importantes na replicação do HDV.

O efeito do silenciamento da HuR na síntese dos HDAGs também foi analisado por *Western blot* utilizando amostras proteicas obtidas nos mesmos ensaios de silenciamento. Os resultados, apresentados na figura IV.4.5.1, mostram que o silenciamento da HuR resulta numa diminuição de 55% ou 93% nos níveis de expressão da S-HDAg ou L-HDAg, respectivamente. Estes resultados indicam que a expressão de HDAGs é inibida quando ocorre o silenciamento da HuR em células Huh7, sugerindo que esta proteína pode desempenhar funções importantes na replicação do HDV.

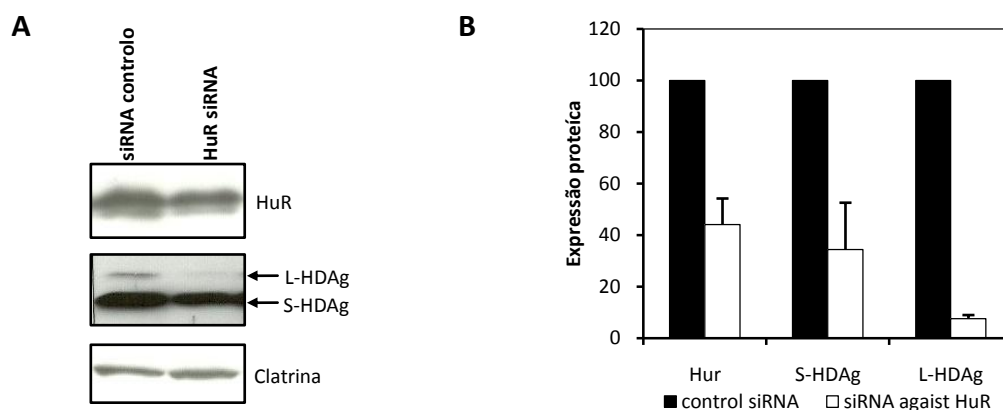


Figura IV.4.5.1: O silenciamento da proteína HuR endógena reduz a expressão de HDAGs em células Huh7-D12. (A) Células Huh7 foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3) e, procedeu-se ao silenciamento da proteína HuR pela utilização de shRNAs em células Huh7. 48 horas após a adição de puomicina, prepararam-se extractos proteicos totais que foram em seguida separados em géis de poliacrilamida 12% por *SDS-PAGE* e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-HuR (painel superior), anti-HDAg (painel do meio) ou anti-clatrina (painel inferior), sendo as imagens apresentadas representativas de três ensaios independentes. (B) As imagens foram digitalizadas e determinaram-se as intensidades das bandas, com a utilização do programa ImageJ. Os valores obtidos para as intensidades de bandas da proteína clatrina foram utilizados para normalizar a quantidade de proteína total. A expressão dos HDAGs e HuR é apresentada como percentagem após comparação com os valores obtidos para o controlo negativo que consistiu na utilização de shRNAs específicos para o mRNA da luciferase.

IV.5 DISCUSSÃO

No capítulo III foi estudada a interacção entre a proteína celular hnRNPc e a S-HDAg, detectada pela pesquisa YTH. Na mesma pesquisa YTH, a proteína HuR, um membro da família ELAVL, foi também identificada como um interactor da S-HDAg. No presente capítulo abordou-se a caracterização desta interacção.

A HuR é uma proteína envolvida na estabilização de mRNAs. Actualmente, é bem estabelecido que a HuR se encontra ubiquamente expressa em células proliferativas e se liga selectivamente a AREs localizados em regiões 3'UTR nos mRNAs. Admite-se que a ligação da HuR a mRNAs antagoniza a etapa de degradação de mRNAs sinalizada pelos AREs (revisto em Brennan e Steitz, 2001).

Alguns estudos prévios têm sugerido a participação da HuR em vários ciclos de replicação virais. Por exemplo, os RNAs nucleares pequenos de HVS contêm uma sequência de ARE que foi descrita como capaz de recrutar a HuR (Cook *et al.*, 2004). Por outro lado, a HuR foi também sugerida como capaz de modular a tradução dos elementos IRES do HIV-1 e HCV actuando como repressor ou activador, respectivamente (Rivas-Aravena *et al.*, 2009).

Estes resultados levaram-nos a investigar o possível envolvimento da HuR na replicação do HDV. A primeira abordagem consistiu em confirmar a interacção HuR/S-HDAg observada no sistema YTH. Deste modo, procedeu-se à co-transformação de células de levedura com os plasmídeos codificantes para as proteínas DNA-BD/S-HDAg e AD/HuR₁₂₋₃₂₆ e avaliou-se novamente a capacidade de activação dos genes repórteres. Os resultados obtidos confirmaram a interacção S-HDAg/HuR no sistema YTH.

A interacção S-HDAg/HuR foi, em seguida, analisada em condições *in vitro* e *in vivo* em células de hepatoma humano. Inicialmente, a sequência da ORF da HuR foi clonada num vector de expressão procariota (pET28c) e a proteína correspondente foi produzida em *E. coli* como fusão com um domínio poli-Hist (His₆/HuR). Em seguida realizou-se um ensaio *blot overlay* com a proteína S-HDAg recombinante purificada e quantidades crescentes da proteína His₆/HuR presente em extractos de *E. coli*. Os resultados obtidos neste ensaio indicaram que a S-HDAg e HuR interactuam especificamente *in vitro*. Finalmente, investigou-se a interacção *in vivo* entre as duas proteínas, em células de fígado humano. Assim, procedeu-se a um ensaio de co-imunoprecipitação utilizando um anticorpo policlonal que reconhece os HDAGs e foi possível detectar a presença da HuR nos imunoprecipitados, o que permitiu confirmar a interacção observada previamente.

A HuR é uma proteína essencialmente nuclear, no entanto, a presença de um HNS permite o tráfego da proteína entre o núcleo e o citoplasma (Fan e Steitz, 1998). Aparentemente a realocização da HuR do núcleo para o citoplasma ocorre como resposta a situações de stress em que a proteína se liga a mRNAs no núcleo acompanhando-os até ao citoplasma e protegendo-os da degradação enzimática (revisto em Brennan e Steitz, 2001). Por sua vez, ambos os HDAGs e RNAs do HDV encontram-se principalmente localizados no núcleo de células infectadas apresentando, na maioria dos casos, uma distribuição núcleoplasmática difusa com localização adicional em focos (Cunha *et al.*, 1998). De modo a analisar a localização sub-celular da HuR em células infectadas pelo HDV e comparar com a localização dos componentes do HDV, procederam-se a ensaios de imunofluorescência e hibridação *in situ*. Os resultados obtidos neste trabalho, em ensaios de imunofluorescência revelaram que a proteína HuR se encontra quase exclusivamente no núcleo de células que expressam os componentes do HDV. A análise das imagens obtidas permitiu calcular OCs, tendo-se verificado que mais de 75% da proteína HuR endógena co-localiza com ambos os RNAs e HDAGs sugerindo que a HuR pode desempenhar funções no ciclo de replicação do HDV.

Previamente, foram publicados resultados de análises proteómicas realizadas em células Huh7 com expressão estável de RNPs de HDV ou expressão transitória de cada um dos componentes do HDV separadamente. Estas análises levaram à identificação de várias proteínas do hospedeiro que apresentam alterações nos seus padrões de expressão normais (Mota *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2009), ainda que os autores não tenham esclarecido interações possíveis entre as proteínas identificadas. Mais recentemente Cao e colaboradores (Cao *et al.*, 2009) utilizaram uma pesquisa proteómica combinada com RNAi e reportaram que duas das proteínas diferencialmente expressas em células Huh7 expressando S-HDAg no estudo de Mota *et al.*, a hnRNPD e a ZNF326, interagem com a S-HDAg. Na tentativa de investigar se a proteína HuR também se encontra diferencialmente expressa em células expressando os componentes do HDV, procedeu-se à comparação das quantidades relativas desta proteína em células Huh7 e Huh7-D12. Realizaram-se análises por *Western blot* de modo a detectar a HuR seguindo-se determinação da intensidade das bandas. Os resultados foram normalizados utilizando um anticorpo contra a proteína *housekeeping* clatrina. Foi possível avaliar que a HuR se encontra 1.7 vezes sobre-expressa em células Huh7-D12, em comparação com Huh7. Tal como antes descrito por Cunha e colaboradores (Cunha *et al.*, 1998), apenas um número limitado (10-15%) de células Huh7-D12 expressam as RNPs do HDV. De acordo com esta observação, os valores da expressão

relativa obtidos nestes ensaios para a HuR, nesta linha celular, pode ser indicativo de uma sobre-regulação significativa na presença do HDV.

Na tentativa de investigar a contribuição da HuR ciclo de replicação do HDV, analisou-se o efeito do seu silenciamento na síntese dos HDAGs em células de hepatoma humano. O silenciamento da HuR com siRNAs específicos resultou numa descida acentuada da expressão de ambos os antigénios S-HDAg e L-HDAg sugerindo uma possível função na replicação do vírus.

Os resultados obtidos ao longo deste estudo são consistentes com a ocorrência de uma interacção relevante entre a S-HDAg e a HuR, no entanto, os mecanismos pelos quais a HuR participa na replicação do HDV, permanecem por explicar. Pelo facto da HuR e S-HDAg serem ambas RBPs é possível que a interacção envolva também o RNA viral.

No caso dos vírus HIV-1 e HCV, a influência da HuR nos respectivos ciclos de replicação parece estar relacionada com a presença de elementos IRES nas extremidades 5'UTR dos mRNAs virais (Rivas-Aravena *et al.*, 2009). Vários estudos demonstraram a participação da proteína HuR na iniciação da tradução, funcionando como uma proteína regulatória de IRES presentes em mRNAs virais e celulares (Korf *et al.*, 2005; Galbán *et al.*, 2008). Por sua vez, dadas as propriedades de sequência e estrutura do mRNA do HDV, que apresenta uma sequência 5'UTR de dimensão reduzida e com um *cap* (Hsieh *et al.*, 1993), não parece possível a ocorrência de elementos IRES. Assim, o envolvimento da HuR na expressão dos HDAGs deve basear-se num mecanismo distinto que não envolve a regulação da tradução mediada por IRES.

Uma das funções moleculares mais associada à HuR é a regulação da estabilidade de mRNAs. Na ausência de uma cauda poli(A), os mRNAs ficam marcados para degradação (Ross, 1995). Nestas situações, a ligação da HuR a sequências 3'UTR dos mRNAs alvo (geralmente sequências AREs), previne a sua degradação (Ford *et al.*, 1999) e, indirectamente, aumenta a expressão proteica. Uma vez que os mRNAs de HDV apresentam cauda poli(A) (Hsieh *et al.*, 1993), não parece provável que a HuR participe na sua estabilização. No entanto, é possível especular que o efeito do silenciamento da HuR na expressão dos HDAGs ocorre devido à estabilização de mRNAs celulares. Deste modo, uma diminuição dos níveis celulares de HuR resultaria numa menor produção de proteínas do hospedeiro necessárias para a replicação do HDV. Esta hipótese pode ser suportada pelas observações que mostram que a HuR estabiliza mRNAs contendo AREs (Brennan e Steitz, 2001), nomeadamente em resposta a

situações de stress, induzidas por choque térmico, luz ultravioleta ou infecções (Wang *et al.*, 2000).

Alternativamente, pelo facto dos RNAs genómico e antigenómico do HDV não se encontrarem poliadenilados, parece também plausível considerar que a HuR contribui para a estabilização destes RNAs durante a replicação ou transcrição.

Os mecanismos pelos quais a HuR promove a estabilização de mRNAs foram analisados por Brennan e colaboradores (Brennan *et al.*, 2000). Em ensaios de co-imunoprecipitação foram identificadas quatro proteínas interactuantes da HuR: SET α , SET β , pp32 e APRIL. A ligação destas proteínas à HuR parece aumentar a afinidade de HuR para mRNAs e assim modular a sua localização intracelular. Uma vez que o comportamento da HuR parece ser modulado pelas interacções proteicas que efectua (Brennan *et al.*, 2000), a identificação neste trabalho de uma interacção entre a S-HDAg e HuR sugere que esta interacção pode estar na base do envolvimento da HuR na replicação do HDV.

Portanto, à semelhança do verificado no capítulo III, os resultados aqui descritos parecem apontar no sentido de que a S-HDAg é fundamental para mediar a ligação de uma proteína celular, a HuR, ao RNA viral. No entanto, também neste caso será vital investigar a ocorrência de interacções entre a HuR e os RNA virais, de modo a explorar esta hipótese.

Por outro lado, é de realçar a obtenção de resultados muito semelhantes com as duas proteínas HuR e hnRNPC. De certo modo esta observação pode resultar do facto de ambas as proteínas desempenharem funções semelhantes, uma vez que se tratam de RBPs e contribuem para aumentar a estabilidade e semi-vida de RNAs (Peng *et al.*, 1998; Rajagopalan *et al.*, 1998). Por outro lado, curiosamente foi descrita a associação entre a HuR e partículas hnRNPs, o que permitiu sugerir uma coordenação de funções entre a HuR e as hnRNPs (Papadopoulou *et al.*, 2010). Também, as duas proteínas actuam em conjunto em alguns ciclos de replicação virais, tal como é o caso do vírus do papiloma humano 1 (Carlsson e Schwartz, 2000) e do HCV (Spångberg *et al.*, 2000). Neste sentido, será interessante estudar em maior detalhe a contribuição da HuR e hnRNPC na replicação do HDV, de modo a analisar se as duas proteínas coordenam funções no sentido de facilitar a replicação viral.

CAPÍTULO V

**EBP2, uma proteína nucleolar importante para a segregação do
genoma do vírus Epstein-Barr, interage com a S-HDAg**

V.1 INTRODUÇÃO

V.1.1. PROTEÍNA 2 DE LIGAÇÃO A EBNA1 (EBP2)

A proteína EBNA1 é uma codificada pelo genoma do EBV, sendo fundamental para a sua replicação e manutenção. O EBV estabelece uma infecção persistente em cerca de 90% da população mundial que se manifesta na forma de mononucleose infecciosa (revisto em Lindner e Sugden, 2007).

Durante a fase de latência, que sucede a infecção, o genoma viral é mantido na forma de epissomas de DNA, no núcleo de células infectadas. A proteína viral EBNA1 e uma região do genoma do vírus, *oriP*, são necessárias e suficientes para a replicação do genoma viral (Yates *et al.*, 1984). A replicação e manutenção do genoma viral de EBV são, portanto, muito dependentes da proteína EBNA1. Para além de facilitar a activação da replicação (Rawlins *et al.*, 1985), a EBNA1 também permite a segregação celular dos epissomas (Reisman e Sugden, 1986; Yates *et al.*, 1988). Assim, a EBNA1 funciona como um factor de segregação de DNA e também como factor de transcrição.

Na tentativa de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos em que a EBNA1 intervém, Shire e colaboradores (Shire *et al.*, 1999) realizaram uma pesquisa YTH para identificar factores celulares com os quais a EBNA1 tem capacidade de interagir. Nessa pesquisa, a proteína EBP2 foi identificada como um interactor de EBNA1. Previamente à sua identificação como interactor da EBNA1, a EBP2 tinha sido descrita como uma proteína componente dos nucléolos, em células humanas em proliferação, ainda que se desconhecesse a sua função celular (Chatterjee *et al.*, 1987).

Pelo facto de apresentar uma localização preferencialmente nucleolar e se encontrar sobre-expressa em células proliferativas, Shire *et al.* decidiram analisar o possível envolvimento na segregação dos epissomas de EBV. Os resultados indicaram que, de facto, a interacção EBP2/EBNA1 parece ser importante para a segregação dos epissomas de EBV durante a divisão celular, mas não para a replicação de DNA do EBV (Shire *et al.*, 2006).

A EBP2 é uma proteína com 306 aa e uma massa molecular de 35 KDa que se encontra muito conservada em eucariotas (Shire *et al.*, 1999; Henning e Valdez, 2001). Pesquisas em bases de dados mostraram que a proteína EBP2 existe como homólogo em outros organismos (*C. elegans*, *S. pombe* e *S. cerevisiae*) e que as sequências destes se encontram muito conservadas nas regiões centrais e C-terminais. Também, foram encontradas homologias na região conservada da EBP2 com porções helicoidais de outras proteínas. A EBP2 foi prevista

como contendo um elevado carácter helicoidal (47% hélice- α) e, a sua região central, foi sugerida como interveniente em interacções do tipo *coiled-coil*. Contudo, não se encontraram outros motivos funcionais evidentes na sequência da EBP2 (Shire *et al.*, 1999).

O homólogo de levedura tem vindo a ser bem estudado (Huber *et al.*, 2000; Tsujii *et al.*, 2000; Horigome *et al.*, 2008). Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que a EBP2 desempenha uma função essencial no processamento de pré-rRNA 27S a rRNA 25S (Huber *et al.*, 2000; Tsujii *et al.*, 2000).

Numa análise YTH independente da realizada por Shire e colaboradores (Shire *et al.*, 1999), a EBP2 foi identificada como um interactor do factor 3 de crescimento de fibroblastos (FGF3), tendo sido designada por proteína de ligação nucleolar (NoBP; Reimers *et al.*, 2001).

O FGF3 pode ocorrer tanto intra como extracelularmente, sendo que, de acordo com a sua localização, se verificam efeitos opostos na proliferação celular. Ao contrário do que se verifica com a forma secretada de FGF3, a forma nuclear inibe a replicação de DNA e a proliferação (Kiefer e Dickson, 1995). Pelo facto da FGF3 nuclear se encontrar maioritariamente associada a nucléolos, e a EBP2/NoBP ser uma proteína nucleolar, a interacção da FGF3 com a EBP2/NoBP foi merecedora de atenção. Neste sentido, Reimers e colaboradores sugeriram que a EBP2/NoBP estaria na origem da localização nucleolar observada para o FGF3 (Reimers *et al.*, 2001).

Também, uma vez que a EBP2/NoBP está associada à proliferação celular (Chatterjee *et al.*, 1987), foi sugerido que a FGF3 pode bloquear as actividades da NoBP, inibindo assim a proliferação celular ao interferir com a biogénese dos ribossomas (Planque, 2006). No entanto, até à data, não se conhecem outros estudos realizados no sentido de explorar esta hipótese.

Reimers e colaboradores obtiveram evidências de que a sobre-expressão da proteína EBP2 humana, numa linha celular de fibroblastos de murganho (NIH 3T3), estimula o crescimento celular (Reimers *et al.*, 2001). Por sua vez, Kappor e colaboradores demonstraram que a supressão da EBP2 humana por siRNAs inibe o crescimento celular (Kapoor *et al.*, 2005). Estes resultados levaram à elaboração da hipótese de que a EBP2 desempenha funções de regulação do ciclo celular.

Para analisar o efeito da sobre-expressão da EBP2 no crescimento celular, Lee e colaboradores analisaram uma linha celular estável HEK293 com expressão constitutiva da proteína EBP2-EGFP. Os autores verificaram que os níveis da ciclina E1, uma oncoproteína, se encontraram elevados nestas células. Também, a expressão ectópica da EBP2-EGFP

nestas células induziu alguma instabilidade nos cromossomas, tendo sido verificada a perda de 4 a 5 cromossomas por célula, ao final de 1 ano de passagens (Lee *et al.*, 2008).

O desenvolvimento e progressão tumoral estão frequentemente associados a aberrações cromossomais, incluindo alterações na estrutura e número (Bayani e Squire, 2001). Deste modo, as evidências obtidas no estudo de Lee *et al.* (2008) sugerem uma relação entre a expressão desregulada da EBP2 e o desenvolvimento tumoral.

Em suma, apesar da EBP2 ter sido alvo de vários estudos, não há uma relação evidente entre os vários processos celulares em que tem sido envolvida. Deste modo as funções celulares desta proteína permanecem por esclarecer.

V.2 OBJECTIVOS

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo:

- Investigar a interacção entre a S-HDAg e a EBP2, previamente identificada pelo sistema YTH.

V.3 MATERIAIS E MÉTODOS

V.3.1 SISTEMA YTH

V.3.1.1 SEQUENCIAÇÃO DE DNA

As reacções de sequenciação para determinar a identidade dos fragmentos de cDNA inseridos em vectores pGADT7-Rec foram efectuadas de acordo com o previamente descrito em III.3.1.1.

V.3.1.2 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LEVEDURA

A preparação de extractos proteicos de clones positivos foi efectuada seguindo o protocolo descrito em II.3.1.6.1 (método ureia/SDS). Para detectar as proteínas pretendidas, os extractos foram submetidos a análise por *Western blot*, tal como descrito em II.3.1.6.2 e II.3.1.6.3, utilizando o anticorpo monoclonal anti-EBP2 de cabra (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:200, em PBS contendo 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

V.3.1.3 (Co)TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

A introdução de DNA plasmídico em células de levedura foi efectuada segundo o método de LiAc, de acordo com o previamente descrito em III.3.1.4.

V.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

V.3.2.1 VECTORES

Os plasmídeos pET28c e pGEX-6P-2, previamente descritos em III.3.2.1, foram utilizados para a expressão de proteínas de fusão com poli-Hist ou GST, respectivamente, de acordo com o protocolo previamente descrito em III.3.2.

V.3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO RECOMBINANTES

Procedeu-se à construção do plasmídeo pET28c/EBP2 para permitir a expressão da proteína EBP2, como fusão com seis resíduos de histidina consecutivos (His₆/ EBP2).

O cDNA correspondente à ORF da EBP2 foi obtido por PCR, tendo sido utilizado como molde o cDNA de EBP2 clonado no plasmídeo pOTB7 (IMAGE clone #3354131; Geneservice Ltd, UK). Os *primers forward* 5' TTATCAATTGCCATGGACACTCCCCGCTC 3' e *reverse* 5'

TTATGTCGACGCGAGTCTTCATTCCTTTTCTTG 3' foram utilizados. As reacções de PCR, hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação foram realizadas de acordo com o previamente descrito em II.3.1.3.

V.3.2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

A produção de proteínas de fusão GST/S-HDAg e His₆/EBP2 seguiu o procedimento descrito em III.3.2.3. A confirmação da expressão das proteínas pretendidas foi realizada por *Western blot*, tal como descrito em III.3.2.3.

V.3.2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína S-HDAg foi realizada por cromatografia de afinidade, tendo sido utilizadas colunas comerciais GStrap (GE Healthcare), de acordo com o procedimento descrito em III.3.2.4.

A purificação da proteína GST/S-HDAg seguiu um procedimento semelhante ao descrito, em III.3.2.4, para a purificação da S-HDAg, não se tendo procedido à clivagem do domínio GST, pela protease PreScission. No final das lavagens da coluna com PBS, a GST/S-HDAg foi eluída com 10mM de glutatona reduzida.

V.3.3 BLOT OVERLAY

O procedimento adoptado nos ensaios de *blot overlay* coincidiu com o descrito em III.3.3, tendo sido utilizados extractos proteicos obtidos de *E. coli*, contendo a proteína His₆/EBP2.

V.3.4 ENSAIOS DE CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE

Nos ensaios de cromatografia de afinidade utilizaram-se partículas magnéticas covalentemente ligadas a moléculas de glutatona reduzida que permitem a imobilização de proteínas de fusão com o domínio GST (MagneGST beads, Promega).

Inicialmente, procedeu-se à imobilização de 10µg de S-HDAg/GST recombinante purificada (V.3.2.4) a 50µL de uma matriz constituída por glutatona líquida covalentemente ligada a partículas magnéticas (MagneGSTTM Protein Purification System; Promega), previamente lavada e ressuspensa em PBS. Seguiu-se incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação, para promover a imobilização das proteínas de fusão à matriz. Paralelamente realizou-se um controlo negativo, em que foi utilizada GST em substituição de S-HDAg/GST. Após três lavagens com PBS, procedeu-se ao bloqueio das partículas, por incubação com PBS contendo 5% de BSA, durante a noite, a 4°C e com agitação.

Efectuaram-se três lavagens com tampão de lavagem [20mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 10% glicerol, 2% BSA], tendo sido, em seguida, adicionados 100µL de extractos proteicos de células *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP, previamente induzidas a produzir a proteína His₆/EBP2 (V.3.2.3) e a mistura foi incubada durante 2 horas, a 4°C, com agitação. Finalmente, as partículas foram submetidas a seis lavagens com tampão de lavagem de elevada restringência [20mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 10% glicerol], previamente arrefecido em gelo, e os complexos proteicos adsorvidos às partículas magnéticas foram eluídos com 30µL de 3x tampão de amostra para *SDS-PAGE*.

As amostras resultantes foram incubadas a 100°C, durante 5 minutos, para promover desnaturação, antes de serem armazenadas a –80°C para posterior análise por *Western blot*.

V.3.5 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Foram utilizadas as linhas celulares Huh7 e Huh7-D12. Os procedimentos de cultura e manipulação das células foram efectuados de acordo com o descrito em III.3.4.

V.3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

A distribuição intracelular das proteínas em estudo foi analisada por imunofluorescência indirecta, de acordo com o descrito em III.3.8, tendo sido utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-HDAg B3 e o anticorpo monoclonal de cabra anti-EBP2 (Santa Cruz Biotechnologies), ambos diluídos 1:100.

V.3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

As amostras biológicas marcadas com fluorocromos foram analisadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss). O processamento dos dados obtidos e análise quantitativa de co-localização entre proteínas foi realizada pela utilização do programa ImageJ (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>) e do plug-in JaCoP (Bolte e Cordelières, 2006), de acordo com o descrito em III.3.10.

V.4 RESULTADOS

V.4.1 A PROTEÍNA EBP2 INTERACTUA COM S-HDAg NO SISTEMA YTH

A proteína EBP2 é outro dos interactores da S-HDAg no sistema YTH, identificados no capítulo II.

Previamente identificada como uma proteína capaz de interagir com EBNA1, a EBP2 é uma proteína que se encontra predominantemente associada a nucléolos e apresenta expressão ubíqua nos tecidos humanos (Shire *et al.*, 1999; Henning e Valdez, 2001).

A análise detalhada da sequência de cDNA, do clone positivo correspondente à EBP2, permitiu verificar que a proteína expressa compreende os aa 162 a 306, ou seja as regiões central e C-terminal da proteína (figura VI.4.1.1 A). Este resultado indica que estas regiões da EBP2 são suficientes para a interacção com a S-HDAg. Estas regiões são as mais conservadas da EBP2 e incluem parcialmente a zona que, segundo Shire e colaboradores, pode participar em interacções *coiled-coil* (Shire *et al.*, 1999).

De modo a confirmar a expressão da proteína de fusão, constituída pela fusão do AD de GAL4 com os aa 162 a 306 da EBP2, AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆, extractos totais de leveduras contendo o clone positivo foram analisados por *Western blot*, utilizando um anticorpo específico para a EBP2. Foi possível detectar a presença de uma proteína com a massa molecular estimada para a AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆, pelo que foi possível confirmar a sua expressão no clone positivo (figura VI.4.1.1).

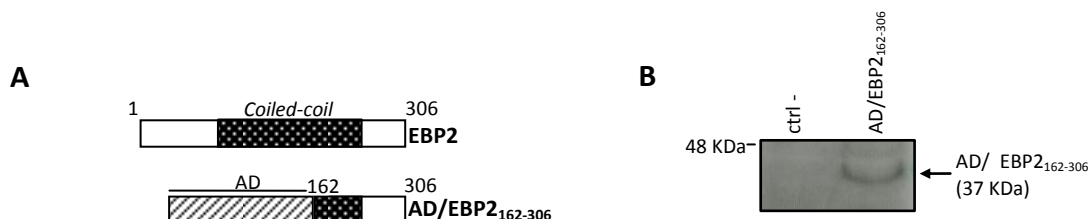


Figura V.4.1.1: Identificação da proteína EBP2 como interactor da S-HDAg no sistema YTH (A) Representação esquemática da proteína EBP2 e da proteína de fusão com o AD de GAL4 (AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆) identificada num clone positivo da pesquisa YTH. A proteína AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆ apresenta uma forma truncada da EBP2, que não inclui 162 aa da extremidade N-terminal. **(B)** Análise por *Western blot* para detecção da presença de AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆ no clone positivo. Extractos proteicos totais do clone positivo foram preparados, separados em géis de 12% poliácridamida por *SDS-PAGE* e a detecção da proteína de interesse foi efectuada pelo anticorpo anti-EBP2. Extractos totais de levedura AH109 não transformada foram utilizados como controlo negativo (ctrl-).

A confirmação da interacção entre as proteínas BD/S-HDAg e AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆, foi efectuada por procedimentos de (co)transformação. Para avaliar se esta interacção é suficiente para a activação dos genes repórteres, o plasmídeo da biblioteca extraído do clone positivo, que contém a sequência parcial do cDNA da EBP2 (pGBKT7-Rec/EBP2₁₆₂₋₃₀₆), foi co-transformado juntamente com o pAS2-1/S-HDAg em células *S. cerevisiae* AH109. Após transformação, as leveduras foram plaqueadas em meios selectivos para avaliação da sua capacidade de activar os genes repórteres (*ADE2*, *HIS3* e *MEL1*). Tal como se observa na figura VI.4.1.2, as células que expressam as duas proteínas BD/S-HDAg e AD/EBP2₁₆₂₋₃₀₆, mas não as que expressam cada uma destas proteínas isoladamente, apresentam capacidade de crescimento em meio mínimo sem os aa triptofano, leucina, histidina e adenina (SD/-Leu/-Trp/-Hist/-Ade). Também se confirma a actividade da α -galactosidase, pelo aparecimento da cor azul resultante da metabolização do substrato X- α -Gal. Deste modo, os resultados obtidos validam a interacção detectada entre S-HDAg e EBP2.

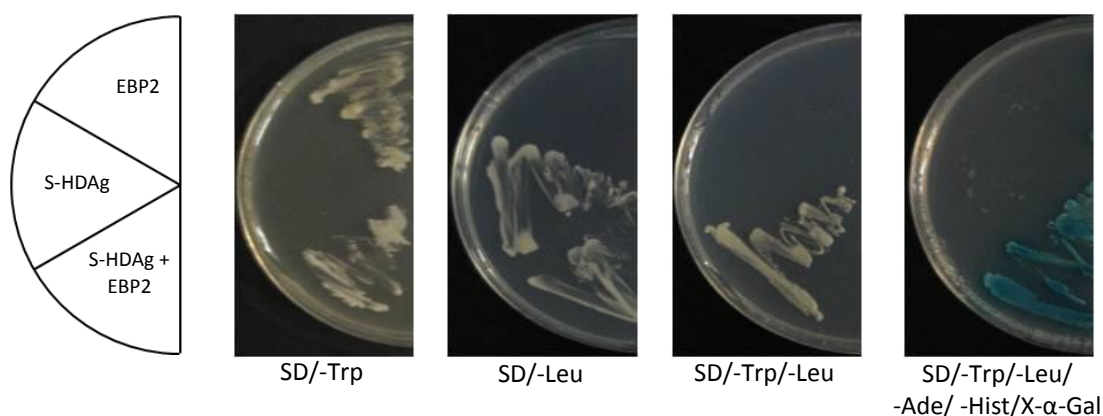


Figura V.4.1.2: Confirmação da interacção entre S-HDAg e EBP2 no sistema YTH. Células de levedura AH109 foram (co)transformadas com plasmídeos que permitem a expressão das proteínas indicadas e as interacções foram testadas pela selecção de crescimento em meios sem os aa leucina e/ou triptofano (SD/-Leu, SD/-Trp e SD/-Trp/-Leu) para seleccionar para as construções em pGADT7-Rec e/ou pAS2-1. A activação dos genes repórteres foi testada em meio de crescimento sem triptofano, leucina, adenina e histidina e contendo X- α -Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-Hist/X- α -Gal).

V.4.2 EBP2 INTERACTUA COM S-HDAg *in vitro*

Actualmente conhecem-se duas proteínas nucleolares com as quais os HDAGs têm capacidade de interagir, a fosfoproteína B23 e a nucleolina (Lee *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Também, os HDAGs encontram-se por vezes acumulados nos nucléolos, ainda que a contribuição desta localização para o ciclo de replicação viral não se encontre bem

esclarecida. Deste modo, a identificação de uma proteína nucleolar, EBP2, como interactor da S-HDAg é um resultado que mereceu investigação adicional.

Assim, uma vez estabelecida a interacção entre a S-HDAg e a EBP2 no sistema YTH, decidiu-se prosseguir com o estudo desta interacção sendo que, inicialmente procedeu-se à sua confirmação *in vitro*, por ensaios de *blot overlay* e de cromatografia de afinidade.

Em ambos os ensaios, foi utilizada a proteína EBP2 fundida com o domínio poli-Hist (His₆/EBP2). O cDNA da EBP2 foi subclonado no vector pET28c e o plasmídeo resultante, pET28c/EBP2, foi transformado em células *E. coli*. Estas células foram induzidas a produzir His₆/EBP2, pela adição de IPTG. A presença da His₆/EBP2 em extractos proteicos destas células foi detectada por *Western blot* com a utilização de um anticorpo específico para o domínio poli-Hist. A figura V.4.2.1 A, apresenta os resultados obtidos, onde é visível a presença da proteína His₆/EBP2 (39 KDa).

No que respeita à S-HDAg, nos ensaios de *blot overlay*, utilizou-se a S-HDAg purificada enquanto nos ensaios de cromatografia de afinidade utilizou-se a proteína de fusão GST/S-HDAg. Em ambos os casos, o vector pGEX-6P-2/S-HDAg foi utilizado para produzir GST/S-HDAg que foi, em seguida, purificada com a utilização de colunas comerciais GSTrap pré-empacotadas com uma matriz de glutathiona (figura IV.4.2.1 B). Para obtenção da S-HDAg, a enzima protease PreScission foi utilizada para separar o domínio GST da S-HDAg, de acordo com o protocolo previamente descrito em III.4.3.1 (ver figura III.4.3.1 B).

No ensaio de *blot overlay*, quantidades crescentes de amostras proteicas contendo a proteína His₆/EBP2 foram aplicadas em géis de 12% poliacrilamida e submetidos a *SDS-PAGE*. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose que foram subsequentemente incubadas com 40µg de S-HDAg recombinante. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-HDAg para detectar a S-HDAg que ficou ligada e os resultados obtidos encontram-se representados na figura V.4.2.2 A. Verifica-se que o aumento da quantidade de His₆/EBP2 corresponde a um aumento proporcional da quantidade de S-HDAg ligada, o que sugere a especificidade da interacção entre as duas proteínas.

Para a cromatografia de afinidade, 10µg de GST/S-HDAg purificada (figura V.4.2.1 B, painel da direita) foram imobilizadas em partículas magnéticas revestidas com glutathiona e incubadas com extractos de *E. coli* contendo His₆/EBP2. Paralelamente, como controlo negativo, a proteína GST foi utilizada num ensaio semelhante.

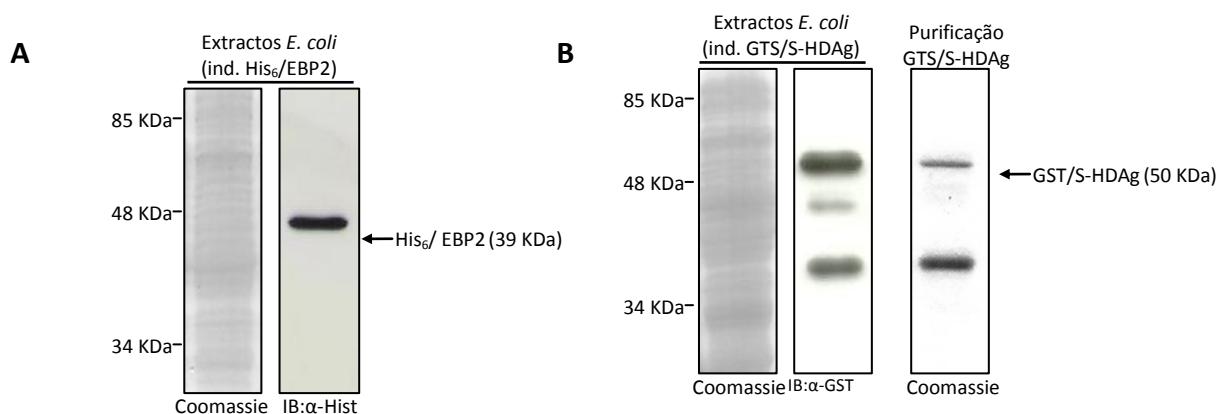


Figura V.4.3.1: Análise por SDS-PAGE e Western blot da proteína recombinante His₆/EBP2 e GST/S-HDAg. (A)

Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP foram transformadas com o plasmídeo pET28c/EBP2 e a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas totais nos extractos foram separadas em géis de 12% poliácridamida por SDS-PAGE. O painel da esquerda corresponde aos extractos totais de *E. coli* separados por electroforese e corados com azul brilhante de Coomassie. O painel da direita corresponde aos mesmos extractos, transferidos para membranas de nitrocelulose, com a detecção da proteína His₆/EBP2 pelo anticorpo anti-Hist. **(B)** Células de *E. coli* BL21 foram transformadas com o plasmídeo pGEX-6P-2/S-HDAg e pACYC-RP e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas totais separadas em géis de 12% poliácridamida por SDS-PAGE. O painel da esquerda corresponde aos extractos totais de *E. coli* separados por electroforese e corados com azul brilhante de Coomassie. O painel do meio corresponde aos mesmos extractos, transferidos para membranas de nitrocelulose, com a detecção da proteína GST/S-HDAg pelo anticorpo anti-GST. O painel da direita corresponde à proteína GST/S-HDAg purificada, submetida a SDS-PAGE com coloração com azul brilhante de Coomassie.

As proteínas com afinidade para a GST/S-HDAg (ou GST) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo em seguida analisadas por Western blot. O anticorpo anti-Hist permitiu detectar a proteína His₆/EBP2 (39KDa) entre as proteínas com afinidade para GST/S-HDAg mas não para a GST (figura V.4.3.1 B). Este resultado mostra que a S-HDAg é necessária para a presença da His₆/EBP2 entre as proteínas imobilizadas na matriz, confirmando assim, novamente, a interacção *in vitro* entre S-HDAg e EBP2.

Portanto, duas abordagens distintas, blot overlay e cromatografia de afinidade, permitiram confirmar a interacção *in vitro* entre S-HDAg e EBP2.

V.4.3 A PROTEÍNA EBP2 CO-LOCALIZA COM OS HDAgs EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Os HDAgs são antigénios de localização essencialmente nuclear. Em algumas células, encontram-se concentrados em focos nucleoplasmáticos enquanto noutras se verifica adicionalmente a sua associação a nucléolos (Cunha *et al.*, 1998). Actualmente não se encontra bem esclarecida a importância da localização nucleolar dos HDAgs para o ciclo de

replicação viral, ainda que vários autores tenham sugerido que a síntese de RNA antigenómico ocorre no nucléolo (Li *et al.*, 2006; Macnaughton e Lai, 2006).

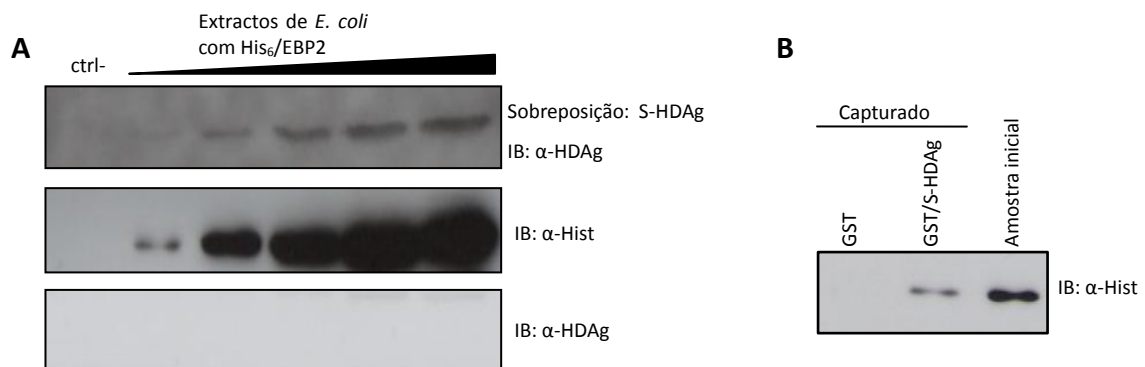


Figura V.4.3.2: Interação *in vitro* de EBP2 e S-HDAg. (A) Ensaio de *blot overlay*. Extractos proteicos de *E. coli* foram preparados após indução de expressão de proteínas recombinantes. Quantidades crescentes de extractos contendo His₆/EBP2 foram separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com a proteína S-HDAg recombinante purificada. Para a detecção de S-HDAg foi utilizado o anticorpo policlonal anti-HDAgs B3 (painel superior). Como controlo negativo (ctrl-) foram utilizados extractos de *E. coli* sem His₆/EBP2. No painel do meio apresenta-se o resultado da análise por *Western blot* dos mesmos extractos com utilização de anticorpo anti-Hist, confirmando a presença de His₆/EBP2 nas amostras. No painel inferior apresenta-se, como controlo negativo, o resultado da análise por *Western blot* com utilização do anticorpo anti-HDAg, comprovando que o anticorpo anti-HDAg não reconhece directamente a His₆/EBP2. (B) Ensaio de cromatografia de afinidade. Extractos proteicos de *E. coli* contendo His₆/EBP2 foram incubados com GST ou com GST/S-HDAg, previamente ligadas a partículas magnéticas MagneGST. No final, as proteínas ligadas a GST ou GST/S-HDAg foram eluídas e separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*. A detecção de His₆/EBP2 entre as proteínas eluídas foi realizada por *Western blot* com utilização do anticorpo anti-Hist.

A EBP2 também apresenta uma localização nucleolar (Chatterjee *et al.*, 1987; Shire *et al.*, 1999). Com o propósito de averiguar a localização subcelular da EBP2 em células que expressam os componentes do HDV, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indirecta e microscopia confocal. Para a marcação das células, um anticorpo policlonal específico para a HDAg (B3) e um policlonal específico para a EBP2 foram utilizados em conjunto com anticorpos secundários conjugados com diferentes fluorocromos (FITC e TR, respectivamente).

Na figura V.4.3.1 observam-se os HDAgs com uma localização nuclear, sendo visível a acumulação em focos nucleoplasmáticos e também nos nucléolos. A EBP2 encontra-se principalmente nos nucléolos, sendo ainda visível uma marcação menos evidente no nucleoplasma.

Assim, observou-se uma co-localização elevada das duas proteínas nos nucléolos. A quantificação da co-localização entre as duas proteínas foi determinada com recurso ao plug-in JaCOP do programa ImageJ, tendo sido obtido o valor de $0,729 \pm 0,084$ ($n=10$) para o OC. O facto de se ter obtido um valor elevado de OC está de acordo com a hipótese das proteínas EBP2 e HDAg interagirem em células de hepatoma humano.

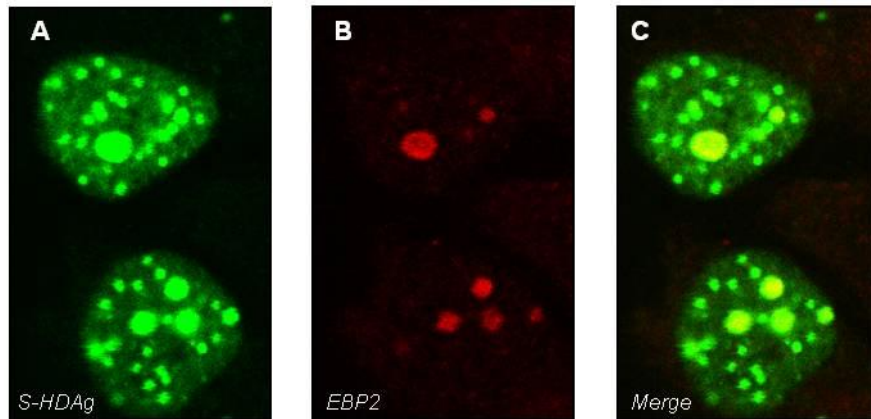


Figura V.4.3.1: Co-localização de EBP2 com os HDAGs. Células Huh7-D12 foram submetidas a marcação por imunofluorescência dupla indirecta para detecção das proteínas HDAG e EBP2. As células foram fixadas com formaldeído a 3.7%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0.5% e marcadas com anticorpos anti-HDAg (A, marcação a verde) e anti-EBP2 (B, marcação a vermelho). O painel C apresenta a sobreposição das imagens A e B.

V.5 DISCUSSÃO

O trabalho descrito neste capítulo teve por objectivo caracterizar a interacção entre a S-HDAg e EBP2 (proteína 2 de ligação a EBNA1) detectada no sistema YTH.

A EBP2 é uma proteína de expressão ubíqua em tecidos humanos (Henning e Valdez, 2001) que apresenta uma localização predominantemente nucleolar (Chatterjee *et al.*, 1987; Shire *et al.*, 1999). Actualmente estão descritas interacções da EBP2 com o EBNA1 (Shire *et al.*, 1999) e também com o FGF3 (Reimers *et al.*, 2001). No entanto, a informação disponível sobre esta proteína é limitada e a principal função que lhe tem sido associada é a de factor de segregação do EBV (Kapoor e Frappier, 2003).

Ainda que a EBP2 seja uma proteína pouco estudada, pelo facto de ser uma proteína de localização nucleolar, tal como por vezes acontece com a S-HDAg, decidiu-se investigar a sua interacção com a S-HDAg. Foi previamente sugerido por vários autores, um possível envolvimento dos nucléolos na replicação do HDV (Li *et al.*, 2006; Macnaughton e Lai, 2006). De facto, os HDAgs interagem com as duas proteínas nucleolares mais abundantes, nucleolina e B23 (Lee *et al.*, 1998 e Huang *et al.*, 2001) e também vários estudos mostraram que, por vezes, os HDAgs se encontram associados aos nucléolos (Han *et al.*, 2009). Neste sentido, o facto de aqui se ter identificado a interacção da S-HDAg com uma outra proteína nucleolar, é um resultado interessante e que pode contribuir para o esclarecimento do envolvimento dos nucléolos na replicação do HDV.

Após a identificação da EBP2 na pesquisa YTH inicial, a realização de ensaios de co-transformação em leveduras permitiu validar a interacção EBP2/S-HDAg no sistema YTH. Para caracterizar a interacção EBP2/S-HDAg, a primeira abordagem consistiu em realizar ensaios de *blot overlay* e cromatografia de afinidade. Estes ensaios permitiram confirmar de que as duas proteínas interagem *in vitro*.

Também, por ensaios de imunofluorescência dupla indirecta, observou-se a co-localização das duas proteínas principalmente nos nucléolos, em células de hepatoma humano.

A continuação do estudo da interacção EBP2/S-HDAg ficou comprometida pelo facto de não se encontrar disponível um anticorpo adequado para os ensaios pretendidos. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-EBP2 (SC-123456) da empresa Santa Cruz Biotechnologies, o único anticorpo específico para a EBP2 disponível comercialmente. Não se conhecem outros trabalhos em que este anticorpo tenha sido previamente utilizado com sucesso. No caso específico dos ensaios desenvolvidos neste trabalho, o anticorpo revelou-se ineficiente para

a utilização em análises por *Western blot*. Note-se que, por ensaios de imunofluorescência, foi possível detectar a presença de EBP2 em células Huh7, mas em análises por *Western blot* de extractos totais de células Huh7 não foi possível detectar a proteína EBP2 (resultados não apresentados). Este facto limitou (muito) os ensaios possíveis de realizar com o objectivo de caracterizar a interacção EBP2/S-HDAg, nomeadamente a confirmação da interacção *in vivo*, por ensaios de co-immunoprecipitação. Também não foi possível proceder a ensaios de silenciamento da EBP2, semelhantes aos realizados para as proteínas HuR e hnRNPC, face à impossibilidade de detectar por *Western blot* a proteína EBP2.

Podem ser efectuadas algumas alterações aos ensaios pretendidos, de modo a que não seja impreterível a utilização do anticorpo anti-EBP2 em análises *Western blot*. No caso do ensaio de co-immunoprecipitação *in vivo*, uma alternativa à utilização deste anticorpo pode incluir a expressão da proteína EBP2 como fusão com um domínio específico (e.g. c-myc, GFP) recorrendo a vectores de expressão eucariota e a utilização de um anticorpo que reconhece o domínio utilizado. Quanto aos ensaios de siRNAs, a análise do silenciamento da EBP2 pode ser realizada por intermédio de procedimentos de PCR em Tempo Real. Contudo, neste trabalho, devido ao tempo limitado de que disponhamos, não foi possível proceder a estes ensaios.

Futuramente, a realização dos ensaios alternativos, propostos assim como a produção de um novo anticorpo específico para a EBP2, são procedimentos que deverão facilitar o estudo da interacção entre a EBP2 e a S-HDAg.

Ainda que não tenha sido possível investigar com algum detalhe a interacção EBP2/S-HDAg, nomeadamente avaliar o efeito do silenciamento da EBP2 na replicação do HDV, neste estudo encontraram-se várias evidências de que a EBP2 é um interactor da S-HDAg. Deste modo, a capacidade da EBP2 interagir com o S-HDAg constitui (mais) um resultado que sugere o envolvimento do nucléolo, na replicação do HDV.

Actualmente reconhece-se a importância do nucléolo nos ciclos de replicação virais. De facto, durante a infecção por vários tipos de vírus humanos, muitos componentes virais são direccionados para os nucléolos onde interagem com diferentes factores celulares. Diversos estudos têm demonstrado que muitas destas modificações nucleolares são importantes em várias fases do ciclo viral, pelo que se admite que o nucléolo é uma estrutura onde ocorrem fases essenciais do ciclo viral (revisto em Greco, 2009).

O HDV parece constituir um exemplo de vírus em que o nucléolo pode desempenhar um papel importante. Ambas as formas dos HDAgs apresentam localização nucleolar e a sua

interacção com a nucleolina contribui para a localização nucleolar dos HDAGs (Lee *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2004). A fosfoproteína B23 também interage com os HDAGs e parece modular a replicação viral (Huang *et al.*, 2001). Alguns resultados sugerem que a síntese do RNA antigenómico a partir do RNA genómico ocorre no nucléolo pela acção da RNA polimerase I e envolve o factor de transcrição selectivo específico da Polimerase I, SL-1 (Li *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007).

Até recentemente, o nucléolo foi considerado essencialmente como o local de formação de ribossomas. No entanto, avanços na área da proteómica revelaram que os nucléolos são estruturas dinâmicas compostas por mais de 700 espécies de proteínas diferentes. Tornou-se evidente que os nucléolos contêm proteínas multifuncionais que podem desempenhar funções essenciais em etapas celulares, para além da biogénese dos ribossomas, e que muitas destas proteínas actuam em resposta a várias perturbações, incluindo stress, doenças celulares e infecções virais (Olson e Dundr, 2005; Couté *et al.*, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Hiscox, 2007; Sirri *et al.*, 2008). Até à data, as funções destas proteínas na replicação viral não estão bem elucidadas. Provavelmente, a EBP2 integra este grupo de proteínas nucleolares multifuncionais, sendo que as suas funções também permanecem pouco esclarecidas.

Tendo em conta as limitações técnicas encontradas neste trabalho, e a pouca informação disponível relativa às funções da EBP2, é difícil sugerir hipóteses que justifiquem a sua participação na replicação do HDV.

Pelo facto da EBP2 possui uma sequência muito conservada entre eucariotas (Henning e Valdez, 2001), pode-se admitir uma função também conservada para esta proteína. Assim, o facto da proteína homóloga de *S. cerevisiae* desempenhar funções importantes na biogénese de rRNA (Hubber *et al.*, 2000), pode sugerir o envolvimento na biogénese de rRNA pela EBP2 humana.

Note-se que a EBP2 de *S. cerevisiae* participa no processamento de rRNAs transcritos pela RNA polimerase I (Tsujii *et al.*, 2000). Admitindo a teoria apoiada por Li e colaboradores (Li *et al.*, 2006), de que a síntese de RNA antigenómico de HDV ocorre por acção da RNA polimerase I, é possível especular uma eventual participação da EBP2 na síntese/processamento de RNA antigenómico.

Alternativamente, também se pode sugerir o envolvimento EBP2 nos mecanismos de patogénese do HDV. Uma vez que foi previamente implicada no controlo do ciclo celular e desenvolvimento tumoral (Lee *et al.*, 2008), a EBP2 poderá ser um dos factores envolvidos

no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular associado à infecção por HDV (Fattovich *et al.*, 2000; Gerin *et al.*, 2001).

CAPÍTULO VI

Estudo da interacção de KPNA4 com o NLS da S-HDAg

VI.1 INTRODUÇÃO

VI.1.1. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS

As células eucariotas possuem compartimentos nucleares e citoplasmáticos distintos, separados pelo invólucro nuclear. Esta organização permite manter os processos de transcrição e tradução separados espacialmente, sendo possível a circulação entre os dois compartimentos através de complexos proteicos que atravessam o invólucro nuclear, denominados complexos dos poros nucleares (NPCs; Rout e Aitchison, 2005).

Os NPCs são constituídos por cerca de 30 proteínas diferentes, as nucleoporinas, que se organizam de modo a comportar um canal de transporte central. O canal central, possuindo cerca de 25 a 30 nm de diâmetro, permite a passagem, por transporte activo, de moléculas de dimensões superiores a 40 kDa. Ao redor deste canal, localizam-se canais mais pequenos onde é possível a passagem de moléculas de dimensões reduzidas, por difusão simples (revisto em Stewart *et al.*, 2007).

Enquanto o processo de difusão simples se encontra limitado a moléculas pequenas, o transporte activo permite o transporte de uma grande variedade de macromoléculas em que se incluem proteínas, RNAs, subunidades ribossomais, ribonucleoproteínas (Görlich e Kutay, 1999; Nakielnny e Dreyfuss, 1999).

O transporte activo é mediado por sinais específicos, presentes nas moléculas a transportar, que, no caso da importação nuclear de proteínas, se designam por NLSs. Apesar de não existir uma sequência consenso entre os NLSs conhecidos, os motivos clássicos consistem em sequências pequenas (5-20 aa) contendo vários resíduos de aa básicos, principalmente de arginina e lisina (Dingwall e Laskey, 1991; Langue *et al.*, 2007). Os NLSs mais simples, os monopartidos, contêm um motivo único, rico em resíduos de aa básicos. Os NLSs bipartidos constituem uma outra classe de NLS e caracterizam-se por incluírem duas sequências, ricas em resíduos de aa básicos, que se encontram próximas, mas não adjacentes (Conti *et al.*, 1998).

Os NLSs são reconhecidos por receptores de transporte que pertencem à família das carioferinas (α ou β). Os membros da família das carioferinas que se encontram envolvidas em processos de importação nuclear tomam o nome de importinas. Para além das importinas, a família das carioferinas também inclui exportinas, proteínas que medeiam os processos de exportação nuclear (Görlich e Kutay, 1999).

Os processos de importação nuclear mediados pelo sistema de importinas α/β constituem a via clássica de importação de proteínas. Nestes processos, as moléculas de importina α são utilizadas como moléculas adaptadoras às quais o NLS da proteína a transportar se liga (Vetter *et al.*, 1999). Por sua vez, a importina α liga-se à importina β que é responsável por direccionar o complexo trimérico para os NPCs, por intermédio de interacções transitórias com nucleoporinas, ocorrendo, em seguida, a importação nuclear (Hodel *et al.*, 2006).

Ainda que o mecanismo não se encontre totalmente claro, sabe-se que as interacções entre importinas e substratos são reguladas pela enzima Ran, uma GTPase que alterna entre as formas ligadas a GTP e a GDP (RanGTP e RanGDP). As duas formas da proteína Ran, distribuem-se assimetricamente entre o núcleo e o citoplasma, encontrando-se a RanGTP predominantemente no núcleo e a RanGDP no citoplasma (Kalab e Heald, 2008), sendo este gradiente de concentrações que determina a direccionalidade do transporte nucleocitoplasmático (Arnaoutov e Dasso, 2005).

Apesar da via clássica de importação nuclear, com a formação do complexo heterotrimérico proteína a importar/importina α /importina β , ser utilizada pela maioria das proteínas, também é possível que moléculas de importina β se liguem directamente aos NLSs de proteínas. As ribonucleoproteínas UsRNP e os componentes do spliceossoma constituem alguns exemplos de moléculas cuja importação nuclear é independente da importina α (Palacios *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1998). Aparentemente, a utilização de moléculas adaptadoras, importina α , para efectuar a ligação entre importina β e a proteína a importar, tal como se verifica na via clássica de importação nuclear, é uma estratégia adoptada pela célula que permite aumentar a especificidade de ligação aos substratos (Quensel *et al.*, 2004).

VI.1.2. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DOS HDAGs

O HDV, à semelhança de muitos outros vírus, replica-se no núcleo das células. Quer os HDAGs quer os RNAs de HDV localizam-se preferencialmente no núcleo de células infectadas (Cunha *et al.*, 1998), pelo que o invólucro nuclear constitui uma barreira à propagação da infecção. Ainda que as dimensões reduzidas dos HDAGs (24 KDa ou 27 KDa) sejam compatíveis com o movimento por difusão passiva através dos NPCs, várias evidências sugerem que o transporte dos HDAGs é dirigido por sinais específicos. Uma explicação para este facto reside no facto dos HDAGs se apresentarem como RNPs constituídas por várias moléculas de HDAGs e RNAs virais (Ryu *et al.*, 1993).

Estudos iniciais levaram à identificação de dois motivos na sequência dos HDAGs, com propriedades de NLS (Chang *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1992). De acordo com Xia *et al.* (1992), um desses motivos consiste numa sequência bipartida localizada entre os aa 67 e 88 do HDAG. Por sua vez, Chang *et al.* (1992) descreveram a sequência situada entre os aa 35 a 44 do HDAG como um NLS capaz de promover a importação nuclear de proteínas heterólogas. Mais recentemente, Alves *et al.* (2008), recorrendo a técnicas de mutagénese dirigida, obtiveram resultados que contrariaram as evidências de ambos os estudos anteriores. Segundo estes autores, o NLS do HDAG é uma sequência monopartida compreendida entre os aa 66 a 75. Ao contrário dos estudos anteriores, em que os presumíveis NLSs foram testados recorrendo a proteínas heterólogas, Alves *et al.* confirmaram também a funcionalidade do NLS identificado, na importação do HDAG nativo. Deste modo, actualmente a sequência localizada entre os aa 66 a 75 da sequência dos HDAGs, identificada por Alves *et al.* é, efectivamente, reconhecida como o NLS dos HDAGs (Alves *et al.*, 2008).

Chou e colaboradores (Chou *et al.*, 1998), com o objectivo de identificarem as vias de importação nuclear utilizadas pelos HDAGs, procederam a estudos para testar a capacidade dos HDAGs interagirem com duas proteínas da família das carioferinas- α . Recorrendo a ensaios de ligação *in vitro* os autores mostraram que o HDAG se liga à carioferina $\alpha 2$ (KPNA2), ainda que o papel desta proteína, na importação nuclear do HDAG não tenha sido esclarecido.

VI.2 OBJECTIVOS

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo:

- Investigar a interacção entre o NLS dos HDAGs e a KPNA4, previamente identificada no sistema YTH.

VI.3 MATERIAIS E MÉTODOS

VI.3.1 SISTEMA YTH

VI.3.1.1 SEQUENCIAÇÃO DE DNA

As reacções de sequenciação para determinar a identidade dos fragmentos de cDNA inseridos em vectores pGADT7-Rec foram efectuadas de acordo com o previamente descrito em III.3.1.1.

VI.3.1.2 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LEVEDURA

A preparação de extractos proteicos de clones positivos foi efectuada seguindo o protocolo descrito em II.3.1.6.1 (método ureia/SDS). Para detectar as proteínas pretendidas, os extractos foram submetidos a análise por *Western blot*, de acordo com o descrito em II.3.1.6.3, utilizando o anticorpo monoclonal anti-KPNA4 de cabra (Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:200 em PBS, contendo 2% leite magro e 0.05% Tween 20.

VI.3.1.3 (Co)TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

A introdução de DNA plasmídico em células de levedura foi efectuada segundo o método de LiAc, de acordo com o previamente descrito em III.3.1.4.

VI.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

VI.3.2.1 VECTORES

Os plasmídeos pET28c e pGEX-6P-2, previamente descritos em III.3.2.1, foram utilizados para a expressão de proteínas de fusão com poli-Hist ou GST, respectivamente, de acordo com o descrito em III.3.2.

VI.3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO RECOMBINANTES

Procedeu-se à construção do plasmídeo pET28c/KPNA4 para permitir a expressão da proteína KPNA4, como fusão com seis resíduos de histidina consecutivos (His₆/ KPNA4).

O cDNA correspondente à ORF da KPNA4 foi obtido por PCR, tendo sido utilizado como molde o cDNA de KPNA4 clonado no plasmídeo pBluescriptR (IMAGE clone #4821602; Geneservice Ltd, UK). Os *primers forward* 5' TTATGGATCCATGGCGGACAACGAGAACTG 3' e

reverse 5' TTATGTCGACCTAAACTGGAACCTTCTGTTG 3' foram utilizados. As reacções de PCR, hidrólises enzimáticas e preparação de misturas de ligação foram realizadas de acordo com o previamente descrito em II.3.1.3.

VI.3.2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

A produção de proteínas de fusão GST/S-HDAg e His₆/KPNA4 seguiu o procedimento descrito em III.3.2.3. A confirmação da expressão das proteínas pretendidas foi realizada por *Western blot*, tal como descrito em III.3.2.3.

VI.3.2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína GST/S-HDAg seguiu um procedimento semelhante ao descrito, em III.3.2.4, para a purificação da S-HDAg, não se tendo procedido à clivagem do domínio GST, pela protease PreScission. No final das lavagens da coluna com PBS, a GST/S-HDAg foi eluída na presença de 10mM glutatona reduzida.

VI.3.3 ENSAIOS DE CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE

O procedimento adoptado nos ensaios de cromatografia de afinidade coincidiu com o descrito em III.3.3, tendo sido utilizados extractos proteicos obtidos de *E. coli*, contendo a proteína His₆/KPNA4.

VI.3.4 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Foram utilizadas as linhas celulares Huh7 e Huh7-D12 cultivadas e manipuladas de acordo com o descrito em III.3.4.

VI.3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

A distribuição intracelular das proteínas em estudo foi analisada por imunofluorescência indirecta, de acordo com o descrito em III.3.8, tendo sido utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-HDAg B3 e o anticorpo monoclonal de cabra anti-KPNA4 (Santa Cruz Biotechnologies), ambos diluídos 1:100.

VI.3.6 MICROSCOPIA CONFOCAL

As amostras biológicas marcadas com fluorocromos foram analisadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss), de acordo com o descrito em III.3.10.

VI.4 RESULTADOS

VI.4.1 A KPNA4 INTERACTUA COM A S-HDAg NO SISTEMA YTH

Tal como descrito no Capítulo II deste trabalho, o sistema YTH foi utilizado com o propósito de pesquisar a identidade de proteínas celulares capazes de interagir com o domínio NLS presente nos HDAgs. O péptido isco utilizado na pesquisa YTH consistiu em três cópias em *tandem* deste domínio, tendo sido obtidos 161 clones positivos.

A análise por sequenciação dos clones positivos levou à identificação da carioferina α 4/importina α 3/Qip1 (KPNA4) como uma proteína interactora do NLS dos HDAgs. A sequenciação total do cDNA correspondente a este clone revelou que a proteína expressa se trata de uma forma truncada da KPNA4 que inclui os aa 1 a 338 (KPNA4₁₋₃₃₈), num total de 555 que constituem a forma nativa da proteína.

A KPNA4 é uma carioferina α , encontrando-se envolvida na via clássica de importação nuclear de proteínas (importina). Liga-se, no citoplasma, directamente a NLSs de proteínas a importar, funcionando como um adaptador entre a proteína a importar e a importina β (revisto em Chook e Süel, 2010). As proteínas da família das carioferinas α possuem um domínio central extenso que consiste em dez regiões *armadillo* (ARM) repetidas em *tandem*. As repetições ARM oferecem dois domínios de ligação a NLSs (Conti *et al.*, 1998). O local principal, para ligação a NLS monopartidos, está localizado nas repetições ARM situadas mais próximas da região N-terminal, ou seja, nas repetições ARM 2 a 4, enquanto o local secundário, necessário nos casos de NLSs bipartidos, reside nas repetições ARM 7 a 9 (Melén *et al.*, 2003; Fagerlund *et al.*, 2005). A proteína produzida no clone positivo, AD/KPNA4₁₋₃₃₈, compreende os ARM 1 a 6 da KPNA4, pelo que inclui o local para ligação a NLSs monopartidos, como é o caso do HDAg. Consequentemente, estas evidências suportam a hipótese de que a KPNA4 poderá interagir com o NLS dos HDAgs *in vivo*.

De modo semelhante ao descrito nos capítulos anteriores, procurou-se confirmar a expressão da KPNA4 no clone positivo em que foi identificada. Assim, foram preparados extractos proteicos totais e estes foram analisados por *Western blot*, tendo sido utilizado o anticorpo anti-Qip1 (Santa Cruz Biotechnologies). Apesar dos esforços, não foi possível detectar a presença de KPNA4 nos extractos do clone positivo. Uma explicação para este resultado pode residir no facto do determinante antigénico, para o anticorpo utilizado, se localizar na região C-terminal da KPNA4. Pelo facto de, no clone positivo, ser produzida uma forma truncada da KPNA4, isto explicaria a incapacidade do anticorpo para a reconhecer. No

entanto, também é possível que o anticorpo utilizado não seja adequado para análises por *Western blot*. De facto, com alguma frequência os anticorpos não reconhecem os respectivos antígenos em condições desnaturantes. Também, no caso do anticorpo comercial utilizado (anti-Qip1; Santa Cruz), não se conhecem, até à data, trabalhos publicados em que tenha sido utilizado com sucesso em análises por *Western blot*. Assim, ainda que não tenha sido possível confirmar a expressão da KPNA4 no clone positivo, a hipótese de HDAg e KPNA4 interagirem não pode ser excluída, pelo que se decidiu prosseguir com o estudo da interacção.

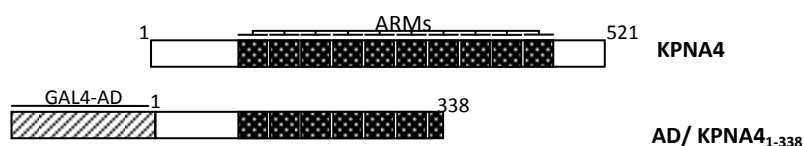


Figura VI.4.1.1: Identificação da proteína KPNA4 como interactor do NLS dos HDAgs no sistema YTH. Representação esquemática da proteína KPNA4 e da proteína de fusão com o AD de GAL4 identificada num clone positivo da pesquisa YTH (AD/KPNA4₁₋₃₃₈). A proteína AD/KPNA4₁₋₃₃₈ apresenta uma forma truncada da KPNA4, que inclui apenas os 338 aa da extremidade N-terminal.

De modo a confirmar as interacções entre KPNA4 e o 3NLS-HDAg, foram realizados ensaios de cotransformação em levedura. Os plasmídeos codificantes para DNA-BD/3NLS-HDAg e AD/KPNA4₁₋₃₃₈ (pAS2-1/3NLS-HDAg + pGADT7-Rec/KPNA4₁₋₃₃₈, respectivamente) foram co-transformados em levedura da estirpe AH109, tendo sido, em seguida, avaliada a capacidade dos transformantes crescerem em meios apropriados para selecção da activação dos genes repórteres. Em paralelo, realizaram-se transformações com os dois plasmídeos isoladamente, para confirmar a incapacidade de auto-activação de genes repórteres. Adicionalmente, o plasmídeo pGADT7-Rec/KPNA4₁₋₃₃₈ foi co-transformado juntamente com o plasmídeo codificante para DNA-BD/S-HDAg (pAS2-1/S-HDAg), com o objectivo de analisar a capacidade de interacção da KPNA4 com a forma integral da S-HDAg. Os resultados mostram que a interacção da KPNA4 também se verifica no contexto da forma integral da S-HDAg (figura VI.4.1.2).

VI.4.2 A PROTEÍNA KPNA4 INTERACTUA COM A S-HDAg *in vitro*

Uma vez estabelecida a interacção entre a S-HDAg e a KPNA4 no sistema YTH, procedeu-se à confirmação da interacção entre as duas proteínas *in vitro*, por ensaios de cromatografia de afinidade.

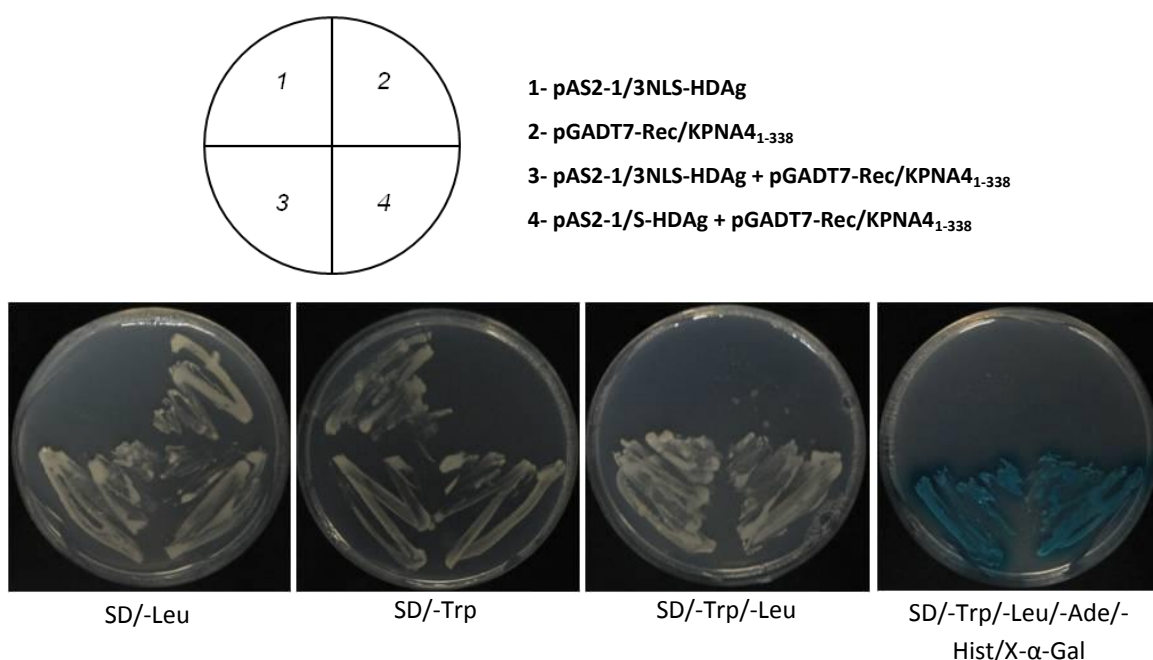


Figura VI.4.1.2: Confirmação da interacção S-HDAg/KPNA4₁₋₃₃₈ no sistema YTH. Células de levedura AH109 foram (co)transformadas com os plasmídeos indicados e as interacções foram testadas pela selecção de crescimento em meios sem os aa leucina e/ou triptofano (SD/-Leu, SD/-Trp e SD/-Trp/-Leu) para seleccionar as construções em pGADT7-Rec e/ou pAS2-1. A activação dos genes repórteres foi testada em meio de crescimento sem triptofano, leucina, adenina e histidina e contendo X-α-Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-Hist/X-α-Gal).

Tal como descrito nos capítulos anteriores, nestes ensaios foram utilizadas proteínas recombinantes. O cDNA da ORF completa da KPNA4 foi subclonado no vector pET28c, para expressão da proteína His₆/KPNA4. A expressão da His₆/KPNA4 (62 KDa) foi analisada por *Western blot*, tendo sido utilizado um anticorpo específico para o domínio poli-Hist. Na figura VI.4.2.1 apresentam-se os resultados das análises por *SDS-PAGE* e *Western blot* de extractos proteicos totais que confirmam a expressão da proteína pretendida.

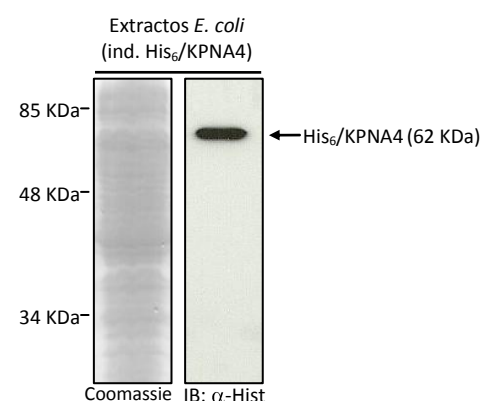


Figura VI.4.2.1: Análise por *SDS-PAGE* e *Western blot* da proteína recombinante His₆/KPNA4. Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP foram transformadas com o plasmídeo pET28c/KPNA4 e a expressão da proteína His₆/KPNA4 foi induzida pela adição de IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas totais nos extractos separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*. O painel da esquerda corresponde aos extractos totais de *E. coli* separados por *SDS-PAGE* e corados com azul brilhante de Coomassie. O painel da direita corresponde aos mesmos extractos, transferidos para membranas de nitrocelulose, com a detecção da proteína His₆/KPNA4 pelo anticorpo anti-Hist.

No ensaio de cromatografia de afinidade, a GST/S-HDAg purificada (ver figura V.4.2.1 B) foi imobilizada em partículas magnéticas revestidas com glutationa e incubada com extractos de *E.coli* contendo His₆/KPNA4. Como controlo negativo, foi utilizada a GST em substituição da GST/S-HDAg. A proteína de fusão GST/S-HDAg foi produzida e purificada de acordo com o descrito no capítulo V.

As proteínas capturadas pela GST/S-HDAg (ou GST), imobilizada nas partículas magnéticas revestidas com glutationa, foram separadas por *SDS-PAGE* e transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo em seguida analisadas por *Western blot*. Foi possível detectar a proteína His₆/KPNA4 (62 KDa) entre as proteínas com afinidade para GST/S-HDAg mas não para a GST (figura VI.4.2.2). Este resultado demonstra que a interacção S-HDAg/KPNA4 detectada pelo sistema YTH pode ser reproduzida em condições *in vitro*.

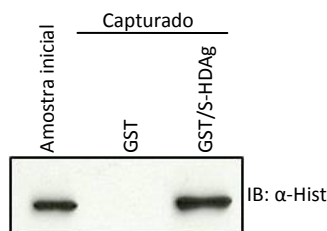


Figura VI.4.2.2: Interacção *in vitro* de KPNA4 e S-HDAg. Ensaio de cromatografia de afinidade. Extractos proteicos de *E. coli* contendo His₆/KPNA4 foram incubados com GST ou com GST/S-HDAg, previamente ligadas a partículas magnéticas MagneGST. No final, as proteínas ligadas a GST ou GST/S-HDAg foram eluídas e separadas em géis de 12% poliacrilamida por *SDS-PAGE*. A detecção de His₆/KPNA4 entre as proteínas eluídas foi realizada por *Western blot* com utilização do anticorpo anti-Hist.

VI.4.3 A KPNA4 É EXPRESSA EM CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO DURANTE A REPLICAÇÃO DO HDV

À semelhança do que se verifica para a maioria das importinas α , a KPNA4 encontra-se expressa em todos os tipos de tecidos, sendo detectada em níveis mais elevados nos testículos, ovários e intestino delgado (Köhler *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 1999).

Para avaliar a presença de KPNA4 em células de fígado humano que expressam os constituintes do HDV, preparam-se extractos proteicos de células Huh7-D12. Não foi possível, por *Western blot*, detectar a presença da KPNA4 nestes extractos (resultados não

apresentados). Contudo, este resultado pode ser consequência da inadequabilidade do anticorpo utilizado e não significar necessariamente a ausência da KPNA4 nestas células. Alternativamente, recorreu-se à técnica de imunofluorescência indirecta para investigar a presença e localização da KPNA4 em células Huh7-D12. A análise por microscopia de fluorescência confocal permitiu confirmar a presença da KPNA4 em células Huh7-D12 e revelou que esta apresenta uma localização tanto citoplasmática como nuclear (figura VI.4.3.1). Observa-se ainda que, aparentemente, a distribuição da KPNA4 não se encontra alterada nas células onde ocorre a replicação do HDV. Também não é visível uma co-localização significativa entre a KPNA4 e os HDAGs (figura VI.4.3.1). Não seria, no entanto, previsível que as duas proteínas apresentassem uma distribuição subcelular semelhante. Admitindo que a importação nuclear dos HDAGs é mediada pela KPNA4, as duas proteínas, juntamente com a importina β , formarão um complexo no citoplasma que é translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, os HDAGs são libertados do complexo, podendo iniciar as suas funções na replicação do HDV, sendo a KPNA4 (e importina β) novamente exportada para o citoplasma.

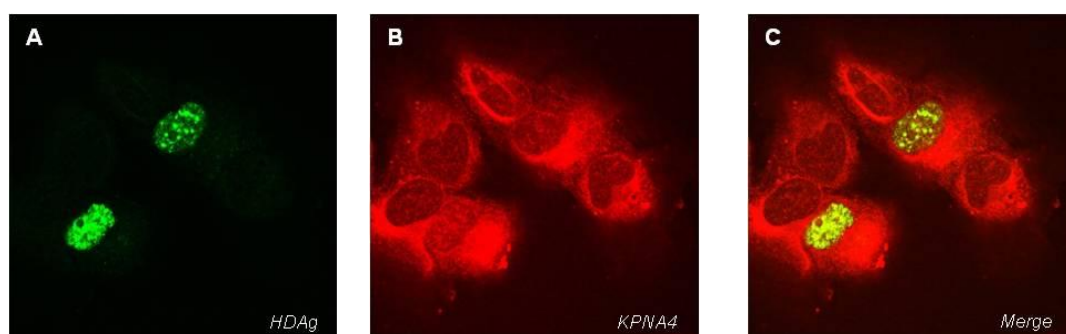


Figura VI.4.3.1: Localização de KPNA4 e HDAg em células de hepatoma humano. Células Huh7-D12 foram submetidas a marcação por imunofluorescência dupla indirecta para detecção das proteínas HDAg e KPNA4. As células foram fixadas com formaldeído a 3.7%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0.5% e marcadas com anticorpos anti-HDAg (A, marcação a verde) e anti-KPNA4 (B, marcação a vermelho). O painel C apresenta a sobreposição das imagens A e B.

VI.5 DISCUSSÃO

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de importação nuclear dos HDAGs.

Os HDAGs, assim como o RNA de HDV, localizam-se preferencialmente no núcleo das células infectadas (Cunha *et al.*, 1998). Várias evidências sugerem que a importação nuclear dos HDAGs é mediada por um NLS e, actualmente, admite-se que este se localiza na região compreendida entre os aa 66 a 75 dos HDAGs (Alves *et al.*, 2008).

Utilizando uma abordagem YTH, descrita no Capítulo II da presente dissertação, pesquisou-se a identidade de proteínas celulares capazes de interagir com o NLS dos HDAGs, previamente identificado por Alves e colaboradores (Alves *et al.*, 2008). Um dos clones positivos obtidos nesta pesquisa YTH permitiu identificar a KPNA4 (carioferina α 4/ importina α 3/Qip1) como um interactor do NLS dos HDAGs.

A KPNA4 pertence à super-família das carioferinas, proteínas envolvidas no transporte activo de moléculas entre o citoplasma e o núcleo. As carioferinas dividem-se em importinas e exportinas, caso se encontrem envolvidas na importação e/ou exportação nuclear, respectivamente, podendo ainda ser do tipo α e β . As importinas α funcionam como moléculas adaptadoras que se ligam directamente ao NLS da proteína a transportar, enquanto as importinas β ligam-se aos complexos carioferina α /proteína a importar e são responsáveis pela interacção deste complexo com os poros nucleares (revisto em Lange *et al.*, 2007).

No caso da KPNA4, trata-se de uma importina α , pelo que a sua identificação como um interactor do NLS dos HDAGs é um resultado possivelmente relevante. Para além disso, a KPNA4 foi descrita como estando envolvida na importação nuclear de diversas proteínas. Entre estas proteínas incluem-se a DNA helicase Q1 (Wang *et al.*, 1998), o activador da transcrição e transductor de sinais 3 (STAT3; Ushijima *et al.*, 2005) ou a proteína 3 de ligação a Ran (RanBP3; Welch *et al.*, 1999). Recentemente, foi também demonstrada a participação da KPNA4 na importação nuclear da integrase do HIV (Ao *et al.*, 2010). Por estas razões, optou-se por caracterizar com maior detalhe a interacção entre a KPNA4 e os HDAGs.

Em primeiro lugar, analisou-se pormenorizadamente a sequência de cDNA codificante para a KPNA4, presente no clone positivo. Esta análise revelou que a proteína produzida consiste numa forma truncada da KPNA4 (AD/KPNA4₁₋₃₃₈), que não engloba a região C-terminal da KPNA4. Em todo o caso, a AD/KPNA4₁₋₃₃₈ inclui as repetições ARMs 2 a 4 que constituem o

local de ligação a NLSs monopartidos (Melén *et al.*, 2003; Fagerlund *et al.*, 2005). Deste modo, parece plausível admitir a interacção entre a KPNA4 e o NLS dos HDAGs *in vivo*, no contexto de células humanas infectadas com HDV.

Procedeu-se, em seguida, à confirmação da interacção entre o NLS dos HDAGs e a KPNA4, em células de levedura. Os ensaios de co-transformação realizados permitiram confirmar a interacção previamente detectada, excluindo assim a hipótese do clone que codifica para a KPNA4 se tratar de um falso positivo. Também, por intermédio de um procedimento de co-transformação foi possível observar que a forma nativa da S-HDAg, e não apenas o NLS, é capaz de interagir com a KPNA4, em levedura. Este foi um resultado importante, uma vez que é fundamental analisar a afinidade de ligação das importinas α aos substratos, não só no contexto do NLS, mas também da forma integral da proteína a transportar. De facto, conhecem-se alguns casos em que um determinado NLS apresenta afinidade para várias importinas, no entanto a forma nativa da proteína que possui o NLS apenas reconhece uma importina específica (Köhler *et al.*, 1999; Melén *et al.*, 2003).

De modo a confirmar da interacção S-HDAg/KPNA4 em condições *in vitro* recorreu-se à técnica de cromatografia de afinidade. As sequências de cDNAs correspondentes às ORFs completas de ambas as proteínas foram clonadas em vectores de expressão procariota, permitindo a expressão das proteínas pretendidas fundidas com domínios específicos, GST/S-HDAg e His₆/KPNA4. Os resultados obtidos neste ensaio permitiram confirmar a interacção entre as duas proteínas *in vitro*. Por sua vez, não foi possível confirmar a ocorrência da interacção S-HDAg/KPNA4 em condições *in vivo*, face à indisponibilidade de um anticorpo adequado para análises por *Western blot* e ensaios de coimunoprecipitação. No entanto, recorrendo à técnica de imunofluorescência dupla indirecta, confirmou-se a expressão da KPNA4 em células de hepatoma humano infectadas com o HDV.

Note-se que durante o estudo da interacção S-HDAg/EBP2 (Capítulo V) ocorreu um problema semelhante. Assim, os ensaios alternativos sugeridos para o estudo da interacção S-HDAg/EBP2 podem também ser, futuramente, aplicados neste caso.

Ainda que os resultados obtidos neste trabalho não permitam confirmar inequivocamente que a KPNA4 se encontra envolvida na importação do HDAg, constituem evidências que sustentam a hipótese da KPNA4 e S-HDAg interagirem.

Actualmente conhece-se um único estudo em que foram realizados esforços no sentido de reconhecer as importinas celulares envolvidas no transporte dos HDAGs para o núcleo. Neste estudo, os autores realizaram ensaios de ligação *in vitro* de modo a avaliar a afinidade de

ligação das carioferinas $\alpha 1$ /importina $\alpha 5$ (KPNA1) e carioferina $\alpha 2$ /importina $\alpha 1$ (KPNA2) aos HDags (Chou *et al.*, 1998). Os resultados obtidos revelaram que o HDag se liga especificamente à KPNA2 mas não à KPNA1. Apesar do estudo sugerir o envolvimento da KPNA2 na importação nuclear dos HDags, a sua função na importação nuclear do HDag não foi explorada. Para além disso, o estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente por não terem sido estudadas todas as importinas α e também por terem sido utilizadas formas truncadas dos HDags. Tal como referido anteriormente, é fundamental investigar a afinidade de interacção no contexto da forma nativa da proteína, uma vez que não só o NLS mas também outras sequências na proteína, nomeadamente as adjacentes ao NLS, são essenciais para definir a especificidade de ligação (Köhler *et al.*, 1999).

Assim, o trabalho descrito neste capítulo constitui o único estudo que demonstra a interacção entre uma importina α (KPNA4) e os HDags, por várias abordagens bioquímicas. Os resultados obtidos constituem ferramentas importantes para a investigação futura da etapa de importação dos HDags. Neste sentido, de modo a avaliar a relevância da interacção será interessante proceder a ensaios de importação *in vitro*, assim como ao silenciamento da KPNA4 celular, avaliando, em seguida, os efeitos causados na importação dos HDags, e consequentemente na replicação viral.

Muitas das proteínas que são importadas para o núcleo podem utilizar, com alguma eficiência, mais do que um membro da família das importinas α (Quensel *et al.*, 2004; Sakakida *et al.*, 2005). Conhecem-se seis membros da família das importinas α , que se dividem em três sub-famílias, de acordo com homologias nas suas sequências. Uma das sub-famílias é constituída pela KPNA4 juntamente com a KPNA3, que apresentam cerca de 80% de homologia (Goldfarb *et al.*, 2004). Neste sentido, futuramente será interessante, investigar a capacidade dos HDags interagirem também com a KPNA3 e, caso esta hipótese se confirme, estudar também o seu envolvimento na importação nuclear dos HDags.

Resumindo, os resultados obtidos neste estudo suportam a hipótese de que a KPNA4 se encontra envolvida na importação nuclear dos HDags que, por sua vez, deverá ocorrer segundo a via clássica de importação de proteínas. A importação nuclear do HDag é um passo essencial no ciclo de replicação do HDV. Admite-se, inclusivamente, que a primeira função biológica do HDag é o transporte do RNA viral para o núcleo de células infectadas, onde ocorre a transcrição do genoma viral (Chou *et al.*, 1998). Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na importação nuclear assume um valor crucial para futuras aplicações terapêuticas que visem a inibição da replicação viral, por inibição da importação

nuclear do genoma do vírus. O HDAg desempenha ainda o papel de activador da replicação viral, pelo que não se verificando a sua localização nuclear, a replicação viral é inibida e consequentemente não ocorre a propagação da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- About-Jaoudé G. and Sureau C. (2005) *Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 79, pp 10460-10466.
- Abou-Jaoudé G. and Sureau C. (2007) *Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thioldisulfide exchange*. J. Virol. Vol. 81, pp 13057–13066.
- Ahlquist P., Noueiry A. O., Lee W. M., Kushner D. B. and Dye B. T. (2003) *Host factors in positive-strand RNA virus genome replication*. J. Virol. Vol. 77, pp 8181-8186.
- Alves C., Freitas N. and Cunha C. (2008) *Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen*. Virology. Vol. 370, pp 12-21.
- Alves C., Freitas N., Penque D., Mota S. and Cunha C. (2009) *Identification of proteins that interact with the NLS of the delta antigen*. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, San Diego, Estados Unidos da America.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R. and Young I. G. (1981) *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature. Vol. 290, pp457-465.
- Ao Z., Huang G., Yao H., Xu Z., Labine M., Cochrane A. W. and Yao X. (2007) *Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication*. J. Biol. Chem. Vol. 282, pp 13456-13467.
- Arnautov A. and Dasso M. (2005) *Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells*. Cell Cycle. Vol. 4, pp 1161-1165.
- Asif-Ullah M., Lévesque M., Robichaud G. and Perreault J. P. (2007) *Development of ribozyme-based gene-inactivations; the example of the hepatitis delta virus ribozyme*. Curr. Gene Ther. Vol. 7, pp 205–216.
- Baker, M. E. (2001). *Hydroxysteroid dehydrogenases: ancient and modern regulators of adrenal and sex steroid action*. Mol. Cell. End. Vol. 175, pp 1-4.
- Barnett S. F., Friedman D. L. and LeStourgeon W. M. (1989) *The C proteins of HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles exist as anisotropic tetramers of (C1)3 C2*. Mol. Cell Biol. Vol. 9, pp 492-498.
- Bartel P. L., Roecklein J. A., SenGupta D. and Fields S. (1996) *A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7*. Nat Genet. Vol. 12, pp 72-77.
- Bayani J. and Squire J. A. (2001) *Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping*. Clin. Genet. Vol. 59, pp 65-73.

- Bell P., Brazas R., Ganem D. and Maul G. G. (2000) *Hepatitis delta virus replication generates complexes of large hepatitis delta antigen and antigenomic RNA that affiliate with and alter nuclear domain 10*. J. Virol. Vol. 74, pp 5329-5336.
- Berggård T., Linse S., and James P. (2007) *Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions*. Proteomics. Vol. 7, pp 2833-2842.
- Bernstein, D. S., Buter, N., Stumpf, C. and Wickens, M. (2002) *Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system*. Methods. Vol. 26, pp. 123-141.
- Boisvert F. M., van Koningsbruggen S., Navascués J. and Lamond A. I. (2007) *The multifunctional nucleolus*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Vol. 8, pp. 574-585.
- Bolinger C. and Boris-Lawrie K. (2009) *Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome*. Retrovirology. 6:8.
- Bolte S., Cordelières FP. (2006) *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. J. Microsc. Vol. 224, pp 213-232.
- Bonino F., Heermann K. H., Rizzetto M. and Gerlich W. H. (1986) *Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope*. J. Virol. Vol. 58, pp 945-950.
- Bordier B. B., Ohkanda J., Liu P., Lee S. Y., Salazar F. H., Marion P. L., Ohashi K., Meuse L., Kay M. A., Casey J. L. , Sebt S. M., Hamilton A. D. and Glenn J. S. (2003) *In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus*. J. Clin. Invest. Vol. 112, pp 407-414.
- Branch A. D. and Robertson H. D. (1984) *A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's*. Science. Vol. 223, pp 450-455.
- Breeden L. and Nasmith K. (1985) *Regulation of the HO gene*. Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 50, pp 643-650.
- Brennan C. M., Gallouzi I. E. and Steitz J. A. (2000) *Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo*. J. Cell. Biol. Vol. 151, pp 1-14.
- Brennan C. M. and Steitz J. A. (2001) *HuR and mRNA stability*. Cell. Mol. Life Sci. Vol. 58, pp 266-277.
- Brent R. and Ptashne M. (1985) *A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene*. Nature. 314:198.
- Brückner A., Polge C., Lentze N., Auerbach D. and Schlattner U. (2009) *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology*. Int. J. Mol. Sci. Vol. 10, pp 2763-2788.
- Brunner, J. E., Nguyen, J. H., Roehl, H. H., Ho, T. V., Swiderek, K. M. and Semler, B. L. (2005) *Functional Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C with Poliovirus RNA Synthesis Initiation Complexes*. Society. Vol. 79, pp 3254-3266.
- Bruss V. and Ganem D. (1991) *The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88, pp 1059-1063.

- Burd C. G., Swanson M. S., Görlach M. and Dreyfuss G. (1989) *Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 86, pp 9788-9792.
- Burd C. G. and Dreyfuss G. (1994) *RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing*. EMBO J. Vol. 13, pp 1197-1204.
- Campos A.-R., Grossman D. and White K. (1985) *Mutant alleles at the locus elav in Drosophila melanogaster lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis*. J. Neurogen. Vol. 2, pp 197-218.
- Cao D., Haussecker D., Huang Y. and Kay M. A. (2009) *Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication*. RNA. Vol. 15, 1971-1979.
- Carlsson A. and Schwartz S. (2000) *Inhibitory activity of the human papillomavirus type 1 AU-rich element correlates inversely with the levels of the elav-like HuR protein in the cell cytoplasm*. Arch. Virol. Vol. 145, pp 491-503.
- Carpenter B., Mackay C., Alnabulsi A., Mackay M., Telfer C., Melvin W. T. and Murray G. I. (2006) *The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression*. Biochim Biophys. Acta. Vol. 1765, pp 85-100.
- Castelnaud C., Le Gal F., Ripault M. P., Gordien E., Martinot-Peignoux M., Boyer N., Pham B. N., Maylin S., Bedossa P., Dény P., Marcellin P. and Gault E. (2006) *Efficacy of peginterferon α -2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up*. Hepatology. Vol. 44, pp 728-735.
- Causier B. and Davies B. (2002) *Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system*. Plant Mol. Biol. Vol. 50, pp 855-870.
- Cavalli G. and Paro R. (1998) *Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation*. Curr. Opin. Cell Biol. Vol. 10, pp 354-360.
- Chang F. L., Chen P. J., Tu S. J., Wang C. J. and Chen D. S. (1991) *The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88, pp 8490-8494.
- Chang M. F., Chang S. C., Chang C. I., Wu K. and Kang H. Y. (1992) *Nuclear localization signals, but not putative leucine zipper motifs, are essential for nuclear transport of hepatitis delta antigen*. J. Virol. Vol. 66, pp 6019-6027.
- Chang J. and Taylor J. (2002). *In vivo RNA-directed transcription, with template switching, by a mammalian RNA polymerase*. EMBO J. Vol. 21, pp 157-164.
- Chang J., Nie X., Chang H. E., Han Z. and Taylor J. (2008) *Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II*. J. Virol. Vol. 82, pp 1118-1127.
- Chao M., Hsieh S. Y. and Taylor J. (1990) *Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication*. J. Virol. Vol. 64, pp 5066-5069.
- Chatterjee A., Freeman J. W. and Busch H. (1987) *Identification and partial characterization of a Mr 40,000 nucleolar antigen associated with cell proliferation*. Cancer Res. Vol. 47, pp 1123-1129.

- Chen P. J., Kalpana G., Goldberg J., Mason W., Werner B., Gerin J. and Taylor J. (1986) *Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 83, pp. 8774-9778.
- Chen Y., Huang W., Hong S., Tsay Y. and Chen P. (2008). *ERK1/2-Mediated Phosphorylation of Small Hepatitis Delta Antigen at Serine 177 Enhances Hepatitis Delta Virus Antigenomic RNA Replication*. J. Virol. Vol. 82, pp 9345-9358.
- Cheng D., Yang A., Thomas H. and Monjardino J. (1993) *Characterization of stable hepatitis delta expressing hepatoma cell lines: effect of HDAg on cell growth*. Prog. Clin. Biol. Res. Vol. 382, pp 149-53.
- Cherry J., Karschner V., Jones H. and Pekala P. H. (2006) *HuR, an RNA-binding protein, involved in the control of cellular differentiation. In vivo*. Vol. 20, pp 17-23.
- Chien C. T., Bartel P. L., Sternglanz R. and Fields S. (1991) *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88, pp 9578-9582.
- Choi S. H., Jeong S. H. and Hwang S. B. (2007) *Large hepatitis delta antigen modulates transforming growth factor-beta signaling cascades: implication of hepatitis delta virus-induced liver fibrosis*. Gastroent. Vol. 132, pp. 343-357.
- Chook Y. M. and Süel K. E. (2010) *Nuclear import by karyopherin-βs: Recognition and inhibition*. Biochim. Biophys Acta. [Epub ahead of print]
- Chou H. C., Hsieh T. Y., Sheu G. T and Lai, M. M. (1998) *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. J. Virol. Vol. 72, pp 3684–3690.
- Chou H. C., Hsieh T. Y., Sheu G. T. and Lai M. M. (1998) *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. J. Virol. Vol. 72, pp 3684-3690.
- Christian K. J., Lang M. A. and Raffalli-Mathieu F. (2008) *Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment*. Mol. Pharmacol. Vol. 73, pp 1558-1567.
- Chung S., Jiang L., Cheng S. and Furneaux H. (1996) *Purification and properties of HuD, a neuronal RNA-binding protein*. J. Biol. Chem. Vol. 271, pp 11518–11524.
- Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G. and Kuriyan J. (1998) *Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α*. Cell. Vol. 94, pp 193-204.
- Cook H. L., Mischo H. E. and Steitz JA. (2004) *The Herpesvirus saimiri small nuclear RNAs recruit AU-rich element-binding proteins but do not alter host AU-rich element-containing mRNA levels in virally transformed T cells*. Mol. Cell. Biol. Vol. 24, pp 4522-4533.
- Couté Y., Burgess J. A., Diaz J. J., Chichester C., Lisacek F., Greco A. and Sanchez J. C. (2006) *Deciphering the human nucleolar proteome*. Mass Spectrom. Rev. Vol. 25, pp 215-234.
- Cross T. J., Rizzi P., Horner M., Jolly A., Hussain M. J., Smith H. M., Vergani D. and Harrison P. M. (2008) *The Increasing Prevalence of Hepatitis Delta Virus (HDV) Infection in South London*. J. Med. Virol. Vol. 80, pp 277-82.
- Cullen B. R. (2003) *Nuclear rna export*. J. Cell. Sci. Vol. 116, pp 587-597.

- Cunha C., Monjardino J., Chang D., Krause S. and Carmo-Fonseca M. (1998) *Location of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells*. RNA. Vol. 4, pp 680-693.
- Cunha C., Freitas N. and Mota S. (2003) *Developments in Hepatitis Delta Research*. The Int. J. Trop. Med. Vol. 1, Numb. 2.
- Cusick M. E., Klitgord N., Vidal M. and Hill D. E. (2005) *Interactome: gateway into systems biology*. Hum. Mol. Genet. Vol. 14, pp 171-81.
- de Chassey B., Navratil V., Tafforeau L., Hiet M. S., Aublin-Gex A., Agaugué S., Meiffren G., Pradezynski F., Faria B. F., Chantier T., Le Breton M., Pellet J., Davoust N., Mangeot P. E., Chaboud A., Penin F., Jacob Y., Vidalain P. O., Vidal M., André P., Rabourdin-Combe C. and Lotteau V. (2008) *Hepatitis C virus infection protein network*. Mol. Syst. Biol. 4:230.
- Değertekin H., Yalçın K., Yakut M. (2006) *The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute and chronic liver diseases in Turkey: an analysis of clinical studies*. Turk. J. Gastroenterol. Vol. 17, pp 25-34.
- Dény P. (2006) *Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?* Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 151–171.
- Deschênes-Furry J., Perrone-Bizzozero N., Jasmin B. J. (2006) *The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity*. Bioessays. Vol. 8, pp 822-833.
- Dingwall C. and Laskey R. A. (1991) *Nuclear targeting sequences--a consensus?* Trends Biochem. Sci. Vol. 16, pp 478-481.
- Dreyfuss G. (1986) *Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles*. Annu. Rev. Cell Biol. Vol. 2, pp 459-498.
- Dreyfuss G., Matunis M. J., Piñol-Roma S. and Burd C. G. (1993) *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA*. Annu. Rev. Biochem. Vol. 62, pp 289-321.
- Dreyfuss G., Kim V. N. and Kataoka N. (2002) *Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 3, pp 195-205.
- Dyer M. D., Murali T. M. and Sobral B. W. (2008) *The Landscape of Human Proteins Interacting with Viruses and Other Pathogens*. PLoS Pathog. 4, e32.
- Eberhardt W., Doller A., Akool el-S. and Pfeilschifter J. (2007) *Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach*. Pharmacol. Ther. Vol. 114, pp 56-73.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001) *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature. Vol. 411, pp 494-498.
- Engelke M., Mills K., Seitz S., Simon P., Gripon P., Schnölzer M. and Urban S. (2006) *Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site*. Hepatology. Vol. 43, pp 750-760.

- Erhardt A., Gerlich W., Starke C., Wend U., Donner A., Sagir A., Heintges T. and Häussinger D. (2006) *Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon- α 2b*. Liver Int. Vol. 26, pp 805–810.
- Fagerlund R., Kinnunen L., Köhler M., Julkunen I. and Melén K. (2005) *NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4*. J. Biol. Chem. Vol. 280, pp 15942-15951.
- Fan X. C. and Steitz J. A. (1998) *HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR*. Proc. Natl. Acad. Sci. U A. Vol. 95, pp 15293-15298.
- Farci P. (2003) *Delta hepatitis: an update*. J. Hepatol. Vol. 39, pp S212–S219.
- Fattovich G., Giustina G., Christensen E., Pantalena M., Zagni I., Realdi G., and Schalm SW. (2000) *Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B*. Gut. Vol. 46, pp 420-426.
- Fiebitz A., Nyarsik L., Haendler B., Hu Y. H., Wagner F., Thamm S., Lehrach H., Janitz M. and Vanhecke D. (2008) *High-throughput mammalian two-hybrid screening for protein-protein interactions using transfected cell arrays*. BMC Genomics. 9:68.
- Fiedler M. and Roggendorf M. (2001) *Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (Marmota monax) model*. Intervirology. Vol. 44, pp 154-161.
- Fiedler M. and Roggendorf M. (2006) *Immunology of HDV infection*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 187-209.
- Fields S. and Song O. (1989) *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature. Vol. 340, pp 245-246.
- Fields S. (2005) *High-throughput two-hybrid analysis*. FEBS J. Vol. 272, pp. 5391-5399.
- Figuerola A., Cuadrado A., Fan J., Atasoy U., Muscat G. E., Muñoz-Canoves P., Gorospe M. and Muñoz A. (2003) *Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes*. Mol. Cell. Biol. Vol. 23, pp 4991-5004.
- Filipovska J. and Konarska M. M. (2000) *Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro*. RNA. Vol. 6, pp 41-54.
- Ford L. P., Watson J., Keene J. D. and Wilusz J. (1999) *ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system*. Genes Dev. 1999 Vol. 13, pp 188-201.
- Ford L. P., Suh J. A., Wright W. E. and Shay, J. W. (2000) *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2 Associate with the RNA Component of Human Telomerase*. Mol. Cell Biol. Vol. 20, pp 9084-9091.
- Fu T. B. and Taylor J. (1993) *The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates*. J. Virol. Vol. 67, pp 6965-6972.
- Gaeta G. B., Stroffolini T., Chiaramonte M., Ascione T., Stornaiuolo G., Lobello S., Sagnelli E., Brunetto M. R. and Rizzetto M. (2000) *Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study*. Hepatology. Vol. 32, pp 824–827.

- Galbán S., Kuwano Y., Pullmann R. Jr., Martindale J. L., Kim H. H., Lal A., Abdelmohsen K., Yang X., Dang Y., Liu J. O., Lewis S. M., Holcík M. and Gorospe M. (2008) *RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 α* . Mol. Cell. Biol. Vol. 28, pp 93-107.
- Gault E. and Study T. (2006) *Eighth Major Clade for Hepatitis Delta Virus*. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9), 1447-1450.
- Gavin A. C., Bösch M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M., Michon A. M., Cruciat C. M., Remor M., Höfert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M. A., Copley R. R., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G. and Superti-Furga G. (2002) *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature. Vol. 415, pp 141-147.
- Gerin, J. L., Casey J. L. and Purcell R.H. (2001) *Hepatitis delta virus*. In: *Virology*, B. N. Fields *et al.*, 4th edition. Chapter 88.
- Gietz RD, Woods RA.(2006) *Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method*. Methods Mol. Biol. Vol. 313, pp 107-20.
- Giles K. M., Daly J. M., Beveridge D. J., Thomson A. M., Voon D. C., Furneaux H. M., Jazayeri J.A. and Leedman P. J. (2003) *The 3'-untranslated region of p21WAF1 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein*. J. Biol. Chem. Vol. 278, pp 2937-2946.
- Giot L., Bader J. S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y. L., Ooi C. E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrola S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., Da Silva A., Zhong J., Stanyon C. A., Finley R. L. Jr, White K. P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R. A., McKenna M. P., Chant J., Rothberg J. M. (2003) *A protein interaction map of Drosophila melanogaster*. Science. Vol. 5, pp 3021727-3021736.
- Glenn J. S., Watson J. A., Havel C. M. and White J. M. (1992) *Identification of a prenylation site in delta virus large antigen*. Science. Vol. 256, pp 1331–1333.
- Glenn J. S. (2006) *Prenylation of HDAG and antiviral drug development*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 133–149.
- Goldfarb D. S., Corbett A. H., Mason D. A., Harreman M. T. and Adam, S. A. (2004). *Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor*. Trends Cell Biol. Vol. 14, pp 505-14.
- Görlach M., Wittekind M., Beckman R. A., Mueller L. and Dreyfuss G. (1992) *Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA*. EMBO J. Vol. 11, pp 3289-3295.
- Görlach D. and Kutay U. (1999) *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. Vol. 15, pp 607-660.
- Gorospe M. (2003) *HuR in the mammalian genotoxic response: post-transcriptional multitasking*. Cell Cycle. Vol. 2, pp 412-414.

- Gowans E. J., Baroudy B. M., Negro F., Ponzetto A., Purcell R. H. and Gerin J. L. (1988) *Evidence for replication of hepatitis delta virus RNA in hepatocyte nuclei after in vivo infection*. Virology. Vol. 167, pp 274-278.
- Greco A. (2009) *Involvement of the nucleolus in replication of human viruses*. Rev. Med. Virol. Vol. 19, pp 201-214.
- Greco-Stewart V. S., Miron P., Abraham A. and Pelchat M. (2007) *The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome*. Virology. Vol. 357, pp 68-78.
- Greco-Stewart V. S., Schissel E. and Pelchat M. (2009) *The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III*. Virology. Vol. 386, pp 12-15.
- Greco-Stewart V. and Pelchat M. (2010) *Interaction of Host Cellular Proteins with Components of the Hepatitis Delta Virus*. Viruses. Vol. 2, pp 189-212.
- Gingras A. C., Gstaiger M., Raught B. and Aebersold R. (2007) *Analysis of protein complexes using mass spectrometry*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 8, pp 645-654.
- Gontarek R. R., Gutshall L. L., Herold K. M., Tsai J., Sathe G. M., Mao J., Prescott C. and Del Vecchio A. M. (1999) *hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome*. Nucleic Acids Res. Vol. 27, pp 457-463.
- Graus F., Bonaventura I., Uchuya M., Valls-Solé J., Reñé R., Leger J. M., Tolosa E. and Delattre J.Y. (1994) *Indolent anti-Hu-associated paraneoplastic sensory neuropathy*. Neurology. Vol. 44, pp 2258-2261.
- Gudima S., Wu S. Y., Chiang C. M., Moraleda G. and Taylor J. (2000) *Origin of hepatitis delta virus mRNA*. J. Virol. Vol. 74, pp 7204-7210.
- Gustin K. E. and Sarnow P. (2001) *Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition*. EMBO J. Vol. 20, pp 240-249.
- Gustin K. E. and Sarnow P. (2002) *Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus*. J. Virol. Vol. 76, pp 8787-8796.
- Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. and Brent R. (1993) *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2*. Cell. Vol. 75, pp 791-803.
- Han Z., Alves C., Gudima S. and Taylor J. (2009) *Intracellular localization of hepatitis delta virus proteins in the presence and absence of viral RNA accumulation*. J. Virol. Vol. 83, pp 6457-6463.
- Harper J. W., Adami G. R., Wei N., Keyomarsi K. and Elledge S. J. (1993) *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell. Vol. 75, pp 805-816.
- Hays L. B., Chen Y. S. and Hu J. C. (2000) *Two-hybrid system for characterization of protein-protein interactions in E. coli*. Biotechniques. Vol. 29, pp 288-994.
- He L. F., Ford E., Purcell R. H., London W. T., Phillips J. and Gerin J. L. (1989) *The size of the hepatitis delta agent*. J. Med. Virol. Vol. 27, pp 31-33.
- Henning D. and Valdez B. C. (2001) *Expression of p40/Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 binding protein 2*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 283, pp 430-436.

- Hinman M. N. and Lou H. (2008) *Diverse molecular functions of Hu proteins*. Cell. Mol. Life Sci. Vol. 65, pp 3168-3181.
- Hiscox J. A. (2007) *RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus*. Nat. Rev. Microbiol. Vol. 5, pp 119-127.
- Hodel A. E., Harreman M. T., Pulliam K. F., Harben M. E., Holmes J. S., Hodel M. R., Berland K. M. and Corbett A. H. (2006) *Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. Vol. 281, pp 23545-23556.
- Holcík M. and Korneluk R. G. (2000) *Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation*. Mol. Cell Biol. Vol. 20, pp 4648-4657.
- Holcík M, Gordon B. W. and Korneluk R. G. (2003) *The Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Protein XIAP is modulated by the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2*. Mol. Cell Biol. Vol. 23, pp 280-8.
- Hsieh S. Y., Chao M., Coates L. and Taylor J. (1990) *Hepatitis delta. genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen*. J. Virol. Vol. 64, pp 3192-3198.
- Hsieh S. Y. and Taylor J. (1991) *Regulation of polyadenylation of hepatitis delta virus antigenomic RNA*. J. Virol. Vol. 65, pp 6438-6446.
- Hsieh T. H., Liu C. J., Chen D. S. and Chen P. J. (2006) *Natural course and treatment of hepatitis D virus infection*. J. Formos. Med. Assoc. Vol. 105, pp 869-81.
- Huang Z. S. and Wu H. N. (1998) *Identification and characterization of the RNA chaperone activity of hepatitis delta antigen peptides*. J. Biol. Chem. Vol. 273, pp 26455-26461.
- Huang W. H., Yung B. Y., Syu W. J. and Lee Y. H. (2001) *The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 25166-25175.
- Huang W. H., Chen Y. S. and Chen P. J. (2008) *Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication*. J. Virol. Vol. 82, pp 692-699.
- Huo T. I., Wu J. C., Lin R. Y., Sheng W. Y., Chang F. Y. and Lee S. D. (1997) *Decreasing hepatitis D virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors*. J. Gastroenterol. Hepatol. Vol. 12, pp 747-751.
- Huber J., Cronshagen U., Kadokura M., Marshallsay C., Wada T., Sekine M. and Lührmann R. (1998) *Snurportin1, an m³G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure*. EMBO J. Vol. 17, pp 4114-4126.
- Huber M. D., Dworet J. H., Shire K., Frappier L. and McAlear M. A. (2000) *The budding yeast homolog of the human EBNA1-binding protein 2 (Ebp2p) is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing*. J. Biol. Chem. Vol. 275, pp 28764-28773.
- Hwang S. B. and Lai M. M. (1993) *Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen*. J. Virol. Vol. 67, pp 7659-7662.
- Hwang B., Lim J. H., Hahm B., Jang S. K. and Lee S. W. (2009) *hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 378, pp 584-588.

- Inoue M., Muto Y., Sakamoto H. and Yokoyama S. (2000) *NMR studies on functional structures of the AU-rich element-binding domains of Hu antigen C*. Nucleic Acids Res. Vol. 28, pp 1743-1750.
- Isaacson M. K., Ploegh H. L. (2009) *Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection*. Cell Host Microbe. Vol. 5, pp 559-570.
- Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M. and Sakaki Y. (2001) *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 98, pp 4569-4574.
- Iwabuchi K., Bartel P. L., Li B., Marraccino R., Fields S. (1994) *Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 91, pp. 6098-6102.
- Jablonski J. A. and Caputi M. (2009) *Role of cellular RNA processing factors in human immunodeficiency virus type 1 mRNA metabolism, replication, and infectivity*. J. Virol. Vol. 83, pp 981-92.
- Jacob Y., Badrane H., Ceccaldi P. E. and Tordo N. (2000) *Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein*. J. Virol. Vol. 74, pp 10217-10222.
- James P., Halladay J. and Craig E. A. (1996) *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast*. Genetics. Vol. 144, pp 1425-1436.
- Jayan G. C. and Casey J. L. (2002a) *Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression*. J. Virol. Vol. 76, pp 12399–12404.
- Jayan G. C. and Casey J.L. (2002b) *Increased RNA editing and inhibition of hepatitis delta virus replication by high-level expression of ADAR1 and ADAR2*. J. Virol. Vol. 76, pp 3819–3827.
- Jeng K. S., Daniel A. and Lai M. M. (1996) *A pseudoknot ribozyme structure is active in vivo and required for hepatitis delta virus RNA replication*. J. Virol. Vol. 70, pp 2403-2410.
- Jensen D. E., Proctor M., Marquis S. T., Gardner H. P., Ha S. I., Chodosh L. A., Ishov A. M., Tommerup N., Vissing H., Sekido Y., Minna J., Borodovsky A., Schultz D. C., Wilkinson K. D., Maul G. G., Barlev N., Berger S. L., Prendergast G. C. and Rauscher F. J. (1998) *BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression*. Oncogene. Vol. 16, pp 1097-1112.
- Joung J. K., Ramm E. I. and Pabo C. O. (2000) *A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97, pp 7382-7387.
- Kalab P. and Heald R. (2008) *The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle*. J. Cell. Sci. Vol. 121, p 1577-1586.
- Kapoor P. and Frappier L. (2003) *EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes*. J. Virol. Vol. 77, pp 6946-6956.
- Kapoor P., Lavoie B. D. and Frappier L. (2005) *EBP2 plays a key role in Epstein-Barr virus mitotic segregation and is regulated by aurora family kinases*. Mol. Cell. Biol. Vol. 25, pp 4934-4945.

- Katsanou V., Papadaki O., Milatos S., Blackshear P. J., Anderson P., Kollias G. and Kontoyiannis D. L. (2005) *HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation*. Mol Cell. Vol. 19, pp 777-789.
- Keene J. D. (1999) *Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96, pp 5-7.
- Key S. C., Yoshizaki T. and Pagano J. S. (1998) *The Epstein-Barr virus (EBV) SM protein enhances pre-mRNA processing of the EBV DNA polymerase transcript*. J. Virol. Vol. 72, pp 8485-8492.
- Kiefer P. and Dickson C. (1995) *Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth*. Mol. Cell. Biol. Vol. 15, pp 4364-4374.
- Kneller E. L., Connor J. H. and Lyles D. S. (2009) *hnRNPs Relocalize to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus*. J. Virol. Vol. 83, pp. 770-780.
- Kim J. H., Paek K. Y., Choi K., Kim T. D., Hahm B., Kim K. T. and Jang S. K. (2003) *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner*. Mol. Cell Biol. Vol. 23, pp 708-720.
- Koegl M. and Uetz P. (2008) *Improving yeast two-hybrid screening systems*. Brief Funct. Genomic Proteomic. Vol. 6, pp 302-312.
- Köhler M., Ansieau S., Prehn S., Leutz A., Haller H. and Hartmann E. (1997) *Cloning of two novel human importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family*. FEBS Lett. Vol. 417, pp 104-108.
- Köhler M., Speck C., Christiansen M., Bischoff F. R., Prehn S., Haller H., Görlich D. and Hartmann E. (1999) *Evidence for distinct substrate specificities of importin α family members in nuclear protein import*. Mol. Cell. Biol. Vol. 19, pp. 7782-7791.
- Köhler M., Fiebler A., Hartwig M., Thiel S., Prehn S., Kettritz R., Luft F. C. and Hartmann E. (2002) *Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation*. Cell Physiol. Biochem. Vol. 12, pp 335-344.
- Koloteva-Levine N., Amichay M. and Elroy-Stein O. (2002) *Interaction of hnRNP-C1/C2 proteins with RNA: analysis using the yeast three-hybrid system*. FEBS Lett. Vol. 523, pp 73-78.
- Komla-Soukha I. and Sureau C. (2006) *A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles*. J. Virol. Vol. 80, pp 4648-4655.
- Korf M., Jarczak D., Beger C., Manns M. P. and Krüger M. (2005) *Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors*. J. Hepatol. Vol. 43, pp 225-234.
- Kos A., Dijkema R., Arnberg A. C., van der Meide P. H. and Schellekens H. (1986) *The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA*. Nature. Vol. 323, pp 558-560.
- Krecic A. M. and Swanson M. S. (1999) *hnRNP complexes: composition, structure, and function*. Curr. Opin. Cell Biol. Vol. 11, pp 363-371.

- Kullmann M., Gopfert U., Siewe B. and Hengst L. (2002) *ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR*. Genes Dev. Vol. 16, pp 3087–3099.
- Kuo M. Y., Sharmeen L., Dinter-Gottlieb G. and Taylor, J. (1988) *Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 62, pp 4439–4444.
- Kuo M. Y., Chao M. and Taylor J. (1989) *Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen*. J. Virol. Vol. 63, pp 1945-1950.
- Kwon H., Imbalzano A. N., Khavari P. A., Kingston R. E. and Green M. R. (1994) *Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex*. Nature. Vol. 370, pp 477-481.
- Laemmli U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. Vol. 227, pp 680–685.
- Lal A., Kawai T., Yang X., Mazan-Mamczarz K. and Gorospe M. (2005) *Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin α* . EMBO J. Vol. 24, pp 1852-1862.
- Lange A., Mills R. E., Lange C. J., Stewart M., Devine S. E. and Corbett A. H. (2007) *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α* . J. Biol. Chem. Vol. 282, pp 5101-5105.
- Le Gal F., Gault E., Ripault M. P., Serpaggi J., Trinchet J. C., Gordien E. and Dény P. (2006) *Eighth major clade for hepatitis delta virus*. Emerg. Infect. Dis. Vol. 12, pp 1447-1450.
- Lazinski D. W. and Taylor J. M. (1993) *Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen*. J. Virol. Vol. 67, pp 2672-2680.
- Lee C. Z., Lin J. H., Chao M., McKnight K. and Lai M. M. (1993) *RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication*. J. Virol. Vol. 67 pp 2221-2227.
- Lee C. H., Chang S. C., Chen C. J. and Chang MF. (1998) *The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting*. J. Biol. Chem. Vol. 273, pp 7650-7656.
- Lee C. H., Chang S. C., Wu C. H. and Chang M. F. (2001) *A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 8142-8148.
- Lee B. H., Yoshimatsu K., Maeda A., Ochiai K., Morimatsu M., Araki K., Ogino M., Morikawa S. and Arikawa J. (2003) *Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules*. Virus Res. Vol. 98, pp 83-91.
- Lee S. Y., Park J. H., Kim S., Park E. J., Yun Y. and Kwon J. (2005) *A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks*. Biochem. J. Vol. 388, pp 7-15.
- Lee M. C., Hsieh C. H., Wei S. C., Shen S. C., Chen C. N., Wu V. C., Chuang L. Y., Hsieh F. J., Wu C. H. and Tsai-Wu J. J. (2008) *Ectopic EBP2 expression enhances cyclin E1 expression and induces chromosome instability in HEK293 stable clones*. BMB Rep. Vol. 41, pp 716-721.

- Lee J. H., Kim S. H., Pascua P. N., Song M. S., Baek Y. H., Jin X., Choi K., Kim C. J., Kim H. and Choi Y. K. (2010) *Direct interaction of cellular hnRNP-F and NS1 of influenza A virus accelerates viral replication by modulation of viral transcriptional activity and host gene expression*. Virology. Vol. 397, pp 89-99.
- Lemay J., Maidou-Peindara P., Bader T., Ennifar E., Rain J. C., Benarous R. and Liu L. X. (2008) *HuR interacts with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, and modulates reverse transcription in infected cells*. Retrovirology 5:47.
- Levine T. D., Gao F., King P. H., Andrews L. G. and Keene J. D. (1993) *Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs*. Mol. Cell. Biol. Vol. 13, pp 3494-3504.
- Li B. and Fields S. (1993) *Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system*. FASEB J. Vol. 7, pp 957-963.
- Li Y. J., Stallcup M. R. and Lai M. M. (2004) *Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication*. J. Virol. Vol. 78, pp 13325-13334.
- Li Y. J., Macnaughton T, Gao L, Lai MM. (2006) *RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies*. J. Virol. Vol. 80, pp 6478-6486.
- Lievens S., Lemmens I. and Tavernier J. (2009) *Mammalian two-hybrids come of age*. Trends Biochem. Sci. Vol. 34, pp 579-588.
- Lindner S. E. and Sugden B. (2007) *The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells*. Plasmid. Vol. 58, pp 1-12.
- López de Silanes I., Zhan M., Lal A., Yang X. and Gorospe M. (2004) *Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 101, pp 2987-2992.
- López de Silanes I., Lal A. and Gorospe M. (2005) *HuR: post-transcriptional paths to malignancy*. RNA Biol. Vol. 2, pp 11-13.
- Lothstein L., Arenstorf H. P., Chung S. Y., Walker B. W., Wooley J. C. and LeStourgeon W. M. (1985) *General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles*. J. Cell Biol. Vol. 100, pp 1570-1581.
- Luo Y., Batalao A., Zhou H. and Zhu L. (1997) *Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system*. Biotechniques. Vol. 22, pp 350-352.
- Ma J. and Ptashne M. (1988) *Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator*. Cell. Vol. 55, pp 443-446.
- Ma W. J., Cheng S., Campbell C., Wright A. and Furneaux H. (1996) *Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein*. J. Biol. Chem. Vol. 271, pp 8144-8151.
- Machida Y. J., Machida Y., Vashisht A. A., Wohlschlegel J. A. and Dutta A. (2009) *The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1*. J. Biol. Chem. Vol. 284, pp 34179-34188.
- Macnaughton T. B., Wang Y. J. and Lai M. M. (1993) *Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites*. J. Virol. Vol. 67, pp 2228-2234.

- Macnaughton T. B., Shi S. T., Modahl L. E. and Lai M. M. (2002) *Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases*. J. Virol. Vol. 76, pp 3920-3927.
- Macnaughton T. B and Lai M. M. (2006) *HDV RNA replication: ancient relic or primer?* Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 25-45.
- Makuwa M., Mints-Ndong A., Souquière S., Nkoghe D., Leroy E. M. and Kazanji M. (2009) *Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa*. J. Clin. Microbiol. Vol. 47, pp 2265-2268.
- Manders E. M., Stap J., Brakenhoff G. J., van Driel R. and Aten J. A. (1992) *Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy*. J. Cell Sci. Vol. 103, pp 857-862.
- Manley G. T., Smitt P. S., Dalmau J. and Posner J. B. (1995) *Hu antigens: reactivity with Hu antibodies, tumor expression, and major immunogenic sites*. Ann Neurol. Vol. 38, pp 102-110.
- Manock S. R., Kelley P. M., Hyams K. C., Douce R., Smalligan R. D., Watts D. M., Sharp T. W., Casey J. L., Gerin J. L., Engle R., Alava-Alprecht A., Martínez C. M., Bravo N. B., Guevara A. G., Russell K. L., Mendoza W. and Vimos C. (2000) *An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador*. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 63, pp 209-213.
- Mazroui R., Di Marco S., Clair E., von Roretz C., Tenenbaum S. A., Keene J. D., Saleh M. and Gallouzi I. E. (2008) *Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis*. J. Cell. Biol. Vol. 180, pp 113-127.
- McAfee J. G., Shahied-Milam L., Soltaninassab S. R. and LeSturgeon W. M. (1996) *A major determinant of hnRNP C protein binding to RNA is a novel bZIP-like RNA binding domain*. RNA. Vol. 2, pp 1139-1152.
- McAlister-Henn L., Gibson N. and Panisko E. (1999) *Applications of the yeast two-hybrid system*. Methods. Vol. 19, pp 330-337.
- Melén K., Fagerlund R., Franke J., Kohler M., Kinnunen L. and Julkunen I. (2003) *Importin α nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein*. J. Biol. Chem. Vol. 278, pp 28193-28200.
- Meng L., Yasumoto H. and Tsai R. Y. (2006) *Multiple controls regulate nucleostemin partitioning between nucleolus and nucleoplasm*. J. Cell Sci. Vol. 119, pp 5124-5136.
- Michaud E. J., Bultman S. J., Stubbs L. J. and Woychik R. P. (1993) *The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein*. Gen. Dev. Vol. 7, pp 1203-1213.
- Modahl L. E. and Lai M. M. (1998) *Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: A new model of HDV RNA transcription and replication*. J. Virol. Vol. 72, pp 5449–5456.
- Modahl L. E., Macnaughton T.B., Zhu N., Johnson D. L. and Lai M. M. (2000) *RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases*. Mol. Cell Biol. Vol. 20, pp 6030-6039.

- Monjardino J. and Lai N. M. C. (1993) *Structure and molecular virology*. In: Zuckerman, Thomas, ed. *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone, pp. 329-340.
- Mota S. and Cunha C. (2003) *Cloning, expression and purification of the hepatitis delta virus small antigen*. National Congress in Microbiology, MICRO'2003, Tomar. Proceedings of the National Congress of Microbiology, B-14.
- Mota S., Mendes M., Penque D., Coelho A. V. and Cunha C. (2008) *Changes in the proteome of Huh7 cells induced by transient expression of hepatitis D virus RNA and antigens*. J. Proteomics. Vol. 71, 71-79.
- Mota S., Mendes M., Freitas N., Penque D., Coelho A. V. and Cunha C. (2009) *Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins*. J. Proteomics. Vol. 72, pp 616-627.
- Mount R. C., Jordan B. E. and Hadfield C. (1996) *Reporter gene systems for assaying gene expression in yeast*. Methods Mol. Biol. Vol. 53, pp 239-248.
- Mu J. J., Chen D. S. and Chen P. J. (2001) *The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication*. J. Virol. Vol. 75, pp 9087-9095.
- Mu J. J., Tsay Y. G., Juan L. J., Fu T. F., Huang W. H., Chen D. S. and Chen P. J. (2004) *The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis*. Virology. Vol. 319, pp 60-70.
- Muchardt C. and Yaniv M. (2001) *When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle*. Oncogene. Vol. 20, pp 3067-3075.
- Murphy F. A. (1996) *Virus taxonomy*. In: Fields B. N., Knipe D. M. and Howley, P. M. editors. *Fields Virology*, 3rd ed. Chapter 2: 15-57.
- Nakielný S. and Dreyfuss G. (1996) *The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals*. J. Cell Biol. Vol. 134, pp 1365-1373.
- Nakielný S. and Dreyfuss G. (1999) *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. Cell. Vol. 99, pp 677-690.
- Navascués CA, Rodríguez M, Sotorrió NG, Sala P, Linares A, Suárez A, and Rodrigo L. (1995) *Epidemiology of hepatitis D virus infection: changes in the last 14 years*. Am. J. Gastroenterol. Vol. 90, pp 1981-1984.
- Neilsen P. M., Cheney K. M., Li C. W., Chen J. D., Cawrse J. E., Schulz R. B., Powell J. A., Kumar R. and Callen D. F. (2008) *Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator*. J. Cell Sci. Vol. 121, pp 3541-3552.
- Niro G. A., Rosina F. and Rizzetto M. (2005) *Treatment of hepatitis D*. J. Viral. Hepat. Vol. 12, pp 2-9.
- Niro G. A., Ciancio A., Gaeta G. B., Smedile A., Marrone A., Olivero A., Stanzione M., David E., Brancaccio G., Fontana R., Perri F., Andriulli A. and Rizzetto M. (2006) *Pegylated interferon α -2b as monotherapy or in combination with Ribavirin in chronic hepatitis delta*. Hepatology. Vol. 44, pp 713-720.

- Noisakran S., Sengsai S., Thongboonkerd V., Kanlaya R., Sinchaikul S., Chen S. T., Puttikhunt C., Kasinrerker W., Limjindaporn T., Wongwiwat W., Malasit P. and Yenchitsomanus P. T. (2008) *Identification of human hnRNP C1/C2 as a dengue virus NS1-interacting protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 372, pp 67-72.
- Ogawa-Goto K., Irie S., Omori A., Miura Y., Katano H., Hasegawa H., Kurata T., Sata T. and Arao Y. (2002) *An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus-permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48*. J. Virol. Vol. 76, pp 2350-2362.
- Ogawa-Goto K., Tanaka K., Ueno T., Tanaka K., Kurata T., Sata T. and Irie S. (2007) *p180 is involved in the interaction between the endoplasmic reticulum and microtubules through a novel microtubule-binding and bundling domain*. Mol. Biol. Cell. Vol. 18, pp 3741-3751.
- Okano H. J. and Darnell R. B. (1997) *A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons*. J. Neurosci. Vol. 17, pp 3024-3037.
- Olson M. O. and Dundr M. (2005) *The moving parts of the nucleolus*. Histochem. Cell. Biol. Vol. 123, pp 203-16.
- Omer C. A. and Gibbs J. B. (1994) *Protein prenylation in eukaryotic microorganisms: genetics, biology and biochemistry*. Mol. Microbiol. J. Vol. 11, pp 219-225.
- O'Neill R. E. and Palese P. (1995) *NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein*. Virology. Vol. 206, pp 116-125.
- Paek K. Y., Kim C. S., Park S. M., Kim J. H. and Jang S. K. (2008) *RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA*. J. Virol. Vol. 82, pp 12082-12093.
- Palacios I., Hetzer M., Adam S. A. and Mattaj J. W. (1997) *Nuclear import of U snRNPs requires importin β* . EMBO J. Vol. 16, pp 6783-6792.
- Papadopolou C., Patrino-Georgoula M. and Guialis A. (2010) *Extensive association of HuR with hnRNP proteins within immunoselected hnRNP and mRNP complexes*. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1804, pp 692-703.
- Pascale A., Amadio M. and Quattrone A. (2008) *Defining a neuron: neuronal ELAV proteins*. Cell Mol Life Sci. Vol. 65, pp 128-140.
- Planque N. (2006) *Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers*. Cell Commun. Signal. 4:7.
- Pei H., Yordy J. S., Leng Q., Zhao Q., Watson D. K. and Li R. (2003) *EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function*. Oncogene. Vol. 22, pp 2699-2709.
- Peng S. S., Chen C. Y., Xu N. and Shyu A. B. (1998) *RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein*. EMBO J. Vol. 17, pp 3461-3470.
- Peng X., Chan E. Y., Li Y., Diamond D. L., Korth M. J. and Katze MG. (2009) *Virus-host interactions: from systems biology to translational research*. Curr. Opin. Microbiol. Vol. 12, pp 432-438.
- Phizicky E. M. and Fields S. (1995) *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*. Microbiol Rev. Vol. 59, pp 94-123.

- Printen J. A. and Sprague G. F. Jr (1994) *Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade*. Genetics. Vol. 138, pp 609-619.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M. and Séraphin B. (2001) *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification*. Methods. Vol. 24, pp 218-229.
- Purcell R. H. and Gerin J. L. (1990) *Hepatitis delta virus*. In: Virology, B. N. Fields et al., eds., Raven Press, New York.
- Quensel C., Friedrich B., Sommer T., Hartmann E. and Kohler M. (2004) *In vivo analysis of importin α proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity*. Mol. Cell. Biol. Vol. 24, pp 10246-10255.
- Radjef N., Gordien E., Ivaniushina V., Gault E., Anaïs P., Drugan T., Trinchet J. C., Roulot D., Tamby M., Milinkovitch M. C. and Dény P. (2004) *Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades*. J. Virol. Vol. 78, pp 2537-2544.
- Rajagopalan L. E., Westmark C. J., Jarzembowski J. A. and Malter J. S. (1998) *hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA*. Nucleic Acids Res. Vol. 26, 3418-3423.
- Ramalho F., Carvalho G., Bonino F., Baptista A. and de Moura, M. C. (1987) *Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal*. Prog. Clin. Biol. Re. Vol. 234, pp 409-417.
- Rawlins D. R., Milman G., Hayward S. D. and Hayward G. S. (1985) *Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region*. Cell. Vol. 42, pp 859-868.
- Reid C. E. and Lazinski D. W. (2000) *A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97, pp 424-429.
- Reimers K., Antoine M., Zapatka M., Blecken V., Dickson C. and Kiefer P. (2001) *NoBP, a nuclear fibroblast growth factor 3 binding protein, is cell cycle regulated and promotes cell growth*. Mol. Cell. Biol. Vol. 21, pp 4996-5007.
- Reisman D. and Sugden B. (1986) *trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1*. Mol. Cell. Biol. Vol. 6, pp 3838-3846.
- Rhodes G. H., Valbracht J. R., Nguyen M. D. and Vaughan J. H. (1997) *The p542 gene encodes an autoantigen that cross-reacts with EBNA-1 of the Epstein Barr virus and which may be a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*. J. Autoimmun. Vol. 10, pp 447-454.
- Rivas-Aravena A., Ramdohr P., Vallejos M., Valiente-Echeverría F., Dormoy-Raclet V., Rodríguez F., Pino K., Holzmänn C., Huidobro-Toro J. P., Gallouzi I. E. and López-Lastra M. (2009) *The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites*. Virology. Vol. 392, 178-185.

Rizzetto M., Canese M. G., Arico S., Crivelli O., Trepo C. and Verme G. (1977) *Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers*. Gut. Vol. 18, pp 997-1003.

Rizzetto M., Hoyer B., Canese M. G., Shih J. W., Purcell R. H. and Gerin J. L. (1980) *δ Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 77, pp 6124-6128.

Rizzetto M., Verme G., Rechia S., Bonino F., Arico S., Caizia R., Picciotto A., Colombo M. and Popper H. (1983) *Chronic HBsAg positive hepatitis with intrahepatic expression of delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment*. Ann. Inter. Med. Vol. 98, pp 437-441.

Rizzetto M. (2009) *Hepatitis D: thirty years after*. J. Hepatol. Vol. 50, pp 1043-1050.

Robinow S. and White K. (1991) *Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development*. J. Neurobiol. Vol. 22, pp 443-461.

Romeo R., Del Ninno E., Rumi M., Russo A., Sangiovanni A., de Franchis R., Ronchi G. and Colombo M. (2009) *A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology. Vol. 136, pp 1629-1638.

Romero F., Germani A., Puvion E., Camonis J., Varin-Blank N., Gisselbrecht S. and Fischer S. (1998) *Vav binding to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C. Evidence for Vav-hnRNP interactions in an RNA-dependent manner*. J. Biol. Chem. Vol. 273, pp 5923-5931.

Ross J. (1995) *mRNA stability in mammalian cells*. Microbiol. Rev. Vol. 59, pp 423-450.

Rout M. P. and Aitchison J. D. (2001) *The nuclear pore complex as a transport machine*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 16593-16596.

Rozen R., Sathish N., Li Y. and Yuan Y. (2008) *Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J. Virol. Vol. 82, pp 4742-4750.

Rual J. F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G. F., Gibbons F. D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D. S., Zhang L. V., Wong S. L., Franklin G., Li S., Albala J. S., Lim J., Fraughton C., Llamas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R. S., Vandenhaute J., Zoghbi H. Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M. E., Hill D. E., Roth F. P. and Vidal M. (2005) *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature. Vol. 437, pp 1173-1178.

Ryu W. S., Bayer M. and Taylor J. (1992) *Assembly of hepatitis delta virus particles*. J. Virol. Vol. 66, pp 2310-2315.

Ryu W. S., Netter H. J., Bayer M. and Taylor J. (1993) *Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 67, pp 3281-3287.

Sakakida Y., Miyamoto Y., Nagoshi E., Akashi M., Nakamura T. J., Mamine T., Kasahara M., Minami Y., Yoneda Y. and Takumi T. (2005) *Importin α/β mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal*. J. Biol. Chem. Vol. 280, pp 13272-13278.

- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Savitz A. J. and Meyer D. I. (1990) *Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum*. *Nature*. Vol. 346, pp 540-544.
- Scholtens D., Vidal M. and Gentleman R. (2005) *Local modeling of global interactome networks*. *Bioinformatics*. Vol. 21, pp 3548-3557.
- SenGupta D. J., Zhang B., Kraemer B., Pochart P., Fields S. and Wickens M. (1996) *A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp 8496-8501.
- Serebriiskii I. G. and Golemis E. A. (2001) *Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination*. *Methods Mol. Biol.* Vol. 177, pp. 123-134.
- Sheu G. T. and Lai M. M. (2000) *Recombinant hepatitis delta antigen from E. coli promotes hepatitis delta virus RNA replication only from the genomic strand but not the antigenomic strand*. *Virology*. Vol. 278, pp 578–586.
- Shire K., Ceccarelli D. F., Avolio-Hunter T. M. and Frappier L. (1999) *EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance*. *J. Virol.* Vol. 73, pp 2587-2595.
- Shire K., Kapoor P., Jiang K., Hing M. N., Sivachandran N., Nguyen T. and Frappier L. (2006) *Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation*. *J. Virol.* Vol. 80, pp 5261-5272.
- Sirri V., Urcuqui-Inchima S., Roussel P. and Hernandez-Verdun D. (2008) *Nucleolus: the fascinating nuclear body*. *Histochem. Cell. Biol.* Vol. 129, pp 13-31.
- Smedile A., Farci P., Verme G., Caredda F., Cargnel A., Caporaso N., Dentico P., Trepo C., Opolon P., Gimson A., Vergani D., Williams R. and Rizzetto M. (1982) *Influence of delta infection on severity of hepatitis B*. *Lancet*. Vol. 2, pp 945-947.
- Smedile A., Rizzetto M. and Gerin J. (1994) *Advances in hepatitis D virus biology and disease*. *Prog. Liver Dis.* Vol. 12, pp 157-175.
- Smedile A., Mangia A., Brunetto M. R., Giarin M., Marzano A., Ottobrelli A., Chiaberge E., Durazzo M., Bonino F. and Verme G. (1993) *Different aspects of HDV and HBV reinfections and liver disease in orthotopic liver transplant (OLT)*. *Prog. Clin. Biol. Res.* Vol. 382, pp 393-402.
- Spångberg K., Wiklund L. and Schwartz S. (2000) *HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities*. *Virology*. Vol. 274, pp 378-390.
- Su C. W., Huang Y. H., Huo T. I., Shih H. H., Sheen I. J., Chen S. W., Lee P. C., Lee S. D. and Wu J. C. (2006) *Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients*. *Gastroenterology*. Vol. 130, pp 1625-1635.
- Sureau C., Guerra B. and Lanford R. E. (1993) *Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion*. *J. Virol.* Vol. 67, pp 366–372.

- Stellberger T., Häuser R., Baiker A., Pothineni V. R., Haas J. and Uetz P. (2010) *Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome*. Proteome Sci. 8:8.
- Stewart M. (2007) *Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Vol. 8, pp 195-208.
- Tan K. P., Shih K. N. and Lo S. J. (2004) *Ser-123 of the large antigen of hepatitis delta virus modulates its cellular localization to the nucleolus, SC-35 speckles or the cytoplasm*. J. Gen. Virol. Vol. 85, pp 1685-1694.
- Tavanez J. P., Cunha C., Silva M. C., David E., Monjardino J., and Carmo-Fonseca M. (2002) *Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm*. RNA. Vol. 8, pp 637-646.
- Taylor J. M. (1992) *The structure and replication of hepatitis delta virus*. Annu. Rev. Microbiol. Vol. 46, pp 253-276.
- Taylor J. M. (1996) *Hepatitis delta virus and its replication*. In Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., eds. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott – Raven, Vol. 258, pp 479-483.
- Taylor J. and Pelchat M. (2010) *Origin of hepatitis delta virus*. Future Microbiol. Vol. 5, pp 393-402.
- Torres J. R. (1996) *Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America*. Gut. Vol. 38, pp 48-55.
- Tseng C. H., Jeng K. S. and Lai M. M. (2008) *Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis*. J. Virol. Vol. 82, pp 9409–9416.
- Tseng C. H., Cheng T. S., Shu C. Y., Jeng K. S. and Lai M. M. (2010) *Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein*. J. Virol. Vol. 84, pp 918-27.
- Tsuji R., Miyoshi K., Tsuno A., Matsui Y., Toh-e A., Miyakawa T. and Mizuta K. (2000) *Ebp2p, yeast homologue of a human protein that interacts with Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, is required for pre-rRNA processing and ribosomal subunit assembly*. Genes Cells. Vol. 5, 543-553.
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S. and Rothberg J. M. (2000) *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature. Vol. 403, pp 623-627.
- Uetz P., Dong Y. A., Zeretzke C., Atzler C., Baiker A., Berger B., Rajagopala S. V., Roupelieva M., Rose D., Fossum E. and Haas J. (2006) *Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome*. Science. Vol. 311, pp 239-242.
- Uetz P. and Stagljar I. (2006) *The interactome of human EGF/ErbB receptors*. Mol. Syst. Biol. 2:2006.0006.
- Urban S. (2008) *New insights into hepatitis B and hepatitis delta virus entry*. Fut. Virol. Vol. 3, pp 253-264.
- Ushijima R., Sakaguchi N., Kano A., Maruyama A., Miyamoto Y., Sekimoto T., Yoneda Y., Ogino K. and Tachibana T. (2005) *Extracellular signal-dependent nuclear import of STAT3 is mediated by various importin α s*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 330, pp 880-886.

- Van Crielinge W. and Beyaert R. (1999) *Yeast Two-Hybrid: State of the Art*. Biol. Proced. Online. Vol. 2, pp 1-38.
- Vaughan J. H., Valbracht J. R., Nguyen M. D., Handley H. H., Smith R. S., Patrick K. and Rhodes G. H. (1995) *Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. I. Immunoglobulin M autoantibodies to proteins mimicking and not mimicking Epstein-Barr virus nuclear antigen-1*. J. Clin. Invest. Vol. 95, pp 1306-1315.
- Verschuuren J. J., Dalmau J., Hoard R. and Posner J. B. (1997) *Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines*. J Neuroimmunol. Vol. 79, 202-210.
- Vetter I. R., Arndt A., Kutay U., Görlich D. and Wittinghofer A. (1999) *Structural view of the Ran-Importin β interaction at 2.3 Å resolution*. Cell. Vol. 97, pp 635-646.
- Vidalain P. O., Boxem M., Ge H., Li S. and Vidal M. (2004) *Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments*. Methods. Vol. 32, pp 363-370.
- von Brunn A., Teepe C., Simpson J. C., Pepperkok R., Friedel C. C., Zimmer R., Roberts R., Baric R. and Haas J. (2007) *Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome*. PLoS One. 2, e459.
- von der Haar T. and Tuite M. F. (2007) *Regulated translational bypass of stop codons in yeast*. Trends Microbiol. Vol. 15, pp 78-86.
- von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S. G., Fields S. and Bork P. (2002) *Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions*. Nature. Vol. 417, pp 399-403.
- Walhout A. J., Boulton S.J. and Vidal M. (2000) *Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm*. Yeast. Vol. 17, pp 88-94.
- Wan L., Kim J. K., Pollard V. W. and Dreyfuss G. (2001) *Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 7681-7688.
- Wang K. S., Choo Q. L., Weiner A. J., Ou J. H., Najarian R. C., Thayer R. M., Mullenbach G. T., Denniston K. J., Gerin J. L. and Houghton M. (1986) *Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome*. Nature. Vol. 323, pp 508-514.
- Wang M. M. and Reed R. R. (1993) *Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast*. Nature. Vol. 364, pp 121-126.
- Wang W. S., Seki M., Yamaoka T., Seki T., Tada S., Katada T., Fujimoto H. and Enomoto T. (1998) *Cloning of two isoforms of mouse DNA helicase Q1/RecQL cDNA; α form is expressed ubiquitously and β form specifically in the testis*. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1443, pp 198-202.
- Wang W., Furneaux H., Cheng H., Caldwell M. C., Hutter D., Liu Y., Holbrook N. and Gorospe M. (2000) *HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light*. Mol. Cell. Biol. Vol. 20, pp 760-769.
- Wedemeyer H., Heidrich B. and Manns M. P. (2007) *Hepatitis D virus infection-not a vanishing disease in Europe!* Hepatology. Vol. 45, pp 1331-1332.
- Wedemeyer H. and Manns M. P. (2010) *Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead*. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. Vol. 7, pp 31-40.

- Welch K., Franke J., Köhler M. and Macara I. G. (1999) *RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin- α 3*. Mol. Cell. Biol. Vol. 19, pp. 8400-8411.
- Wong S. K. and Lazinski D. W. (2002) *Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 99, pp 15118–15123.
- Woodage T., Basrai M. A., Baxevanis A. D., Hieter P. and Collins F. S. (1997) *Characterization of the CHD family of proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. Vol. 94, pp 11472-11477.
- Wu J.C. (2006) *Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection*. Curr Top Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 173–186.
- Xia Y. P., Yeh C. T., Ou J. H. and Lai M. M. (1992) *Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex*. J. Virol. Vol. 66, pp 914-921.
- Xu G. L., Pan Y. K., Wang B. Y., Huang L., Tian L., Xue J. L., Chen J. Z. and Jia W. (2008) *TTRAP is a novel PML nuclear bodies-associated protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 375, pp 395-398.
- Yates J., Warren N., Reisman D. and Sugden B. (1984) *A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 81, pp 3806-3810.
- Yates J. L., Camiolo S. M. and Bashaw JM. (2000) *The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP*. J. Virol. Vol. 74, pp 4512-4122.
- Yurdaydin C., Bozkaya H., Karaaslan H., Onder F. O., Erkan O. E., Yalçın K., Değertekin H., Bozdayi A M. and Uzunalimoğlu O. (2007) *A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis*. J. Viral. Hepat. Vol. 14, pp 812–816.
- Yurdaydin C., Bozkaya H., Onder F. O., Sentürk H., Karaaslan H., Akdoğan M., Cetinkaya H., Erden E., Erkan-Esin O., Yalçın K., Bozdayi A. M., Schinazi R. F., Gerin J. L., Uzunalimoğlu O. and Ozden A. (2008) *Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon*. J. Viral. Hepat. Vol. 15, pp 314–321.
- Zhang A., Yeung P. L., Li C. W., Tsai S. C., Dinh G. K., Wu X., Li H. and Chen J. D. (2004) *Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators*. J. Biol. Chem. Vol. 279, pp 33799-33805.
- Zhang J. Q., Wang J. J., Li W. J., Huang L., Tian L., Xue J. L., Chen J. Z. and Jia W. (2009) *Cellular protein TTRAP interacts with HIV-1 integrase to facilitate viral integration*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 387, pp 256-260.